

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

**Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp**

**Die Plastizität des olfaktorischen Systems in einem Mausmodell
von Morbus Niemann-Pick Typ C1**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Anja Meyer,
geb. am 17.04.1985

Rostock, 2019

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002878

Gutachter

Prof. Dr. Dr. Martin Witt, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Anatomie

Prof. Dr. Dr. Andreas Hermann, Universitätsmedizin Rostock, Albrecht-Kossel-Institut

Prof. Dr. Thomas Hummel, TU Dresden, Uniklinikum Carl Gustav Carus

Datum der Einreichung: 2019

Datum der Verteidigung: 2020

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet, und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Wettmershagen, den 18.12.2019

Anja Meyer

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung.....	8
Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit.....	10
Beiträge auf wissenschaftlichen Fachkongressen.....	11
1. Einleitung	12
1.1. <i>Olfaktorische Wahrnehmung</i>	13
1.1.1. Olfaktorisches Epithel	13
Basalzellen	14
Olfaktorische Rezeptorneurone.....	15
Stützzellen.....	16
Lamina propria.....	16
1.1.2. Bulbus olfactorius.....	17
Adulte Neurogenese	18
Periglomeruläre Zellen.....	18
Mitral- und Büschelzellen	18
Körnerzellen.....	20
Short axon Zellen	20
1.2. <i>Morbus Niemann-Pick Typ C1</i>	21
1.2.1. Ätiologie von Niemann-Pick Typ C	21
1.2.2. Klinischer Verlauf	24
1.2.3. Diagnostik.....	25
1.2.4. Therapie	26
Miglustat (Zavesca®).....	27
Allopregnanolon (Pregnan-3-alpha-ol-20-one).....	28
Cyclodextrin (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin).....	29
Andere Therapieoptionen.....	31
1.2.5. NPC1-Mausmodell.....	32
2. Ziel und Fragestellung	34
3. Material und Methoden	35
3.1. <i>Tiere</i>	35
3.1.1. Genotypisierung	35
3.1.2. Pharmakologische Behandlung.....	35
3.1.3. 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU)-Injektionen	37
3.2. <i>Histologische Aufarbeitung</i>	38
3.2.1. Probenpräparation.....	38
3.2.2. Immunhistochemie	38
3.3. <i>Stereologische Analyse</i>	40
3.3.1. Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen im OE	41
3.3.2. Quantifizierung der OMP-positiven und Cas-3-positiven Zellen im OE	41
3.3.3. Quantifizierung der BrdU-positiven und TH-positiven Zellen im OB	41
3.4. <i>Buried Pellet Test</i>	42
3.5. <i>Statistische Auswertung</i>	43

4. Ergebnisse	44
4.1. <i>Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen im olfaktorischen Epithel</i>	44
4.1.1. Ergebnisse der H.E.-Übersichtsfärbung im OE	44
4.1.2. Ergebnisse der BrdU - Reaktivität im OE	46
4.1.3. Ergebnisse der OMP Reaktivität im OE	48
4.1.4. Ergebnisse der Cas-3 Reaktivität im OE	51
4.1.5. Ergebnisse der GAP43 Reaktivität im OE	54
4.1.6. Ergebnisse der CathD Reaktivität im OE	55
4.2. <i>Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen im Bulbus olfactorius (OB)</i>	57
4.2.1. Ergebnisse der H.E.-Übersichtsfärbung im OB	57
4.2.2. Ergebnisse der BrdU - Reaktivität im OB	58
4.2.3. Ergebnisse der Tyrosinhydroxylase (TH) - Reaktivität im OB	61
4.2.4. Ergebnisse der Iba1 - Reaktivität im OB	64
4.2.5. Ergebnisse der GFAP - Reaktivität im OB	66
4.2.6. Ergebnisse der Cas-3 - Reaktivität im OB	67
4.3. <i>Ergebnisse der Riechtests</i>	69
4.3.1. Ergebnisse des Buried Pellet Tests	69
4.3.2. Ergebnisse des Surface Pellet Tests	72
5. Diskussion.....	74
5.1. <i>Der Normalzustand in den unbehandelten Npc1^{+/+} Kontrollmäusen.....</i>	75
5.2. <i>Schwere neurodegenerative Veränderungen bei den Npc1^{-/-} Mäusen.....</i>	76
5.3. <i>Reduzierte Riechleistung im Buried Pellet Verhaltenstest bei den Npc1^{-/-} Mäusen.....</i>	78
5.4. <i>Die Kombinations-Behandlung reduziert neuropathologische Prozesse und verbessert die Riechfähigkeit bei den Npc1^{-/-} Mäusen</i>	78
5.5. <i>Die HPβCD-Behandlung normalisiert die Riechleistung und reduziert die Neuropathologie im OE bei den Npc1^{-/-} Mäusen</i>	80
5.6. <i>Limitierungen der Therapie bei Npc1^{-/-}</i>	82
5.7. <i>Die Kombinationsbehandlung reduziert morphologische Veränderungen in den Npc1^{-/-} effektiver als die HPβCD-Behandlung.....</i>	83
5.8. <i>Therapieassoziierte Effekte bei NPC1^{+/+}</i>	84
5.9. <i>Unterschiede im Regenerationsverhalten von OE und OB</i>	86
6. Ausblick	88
7. Thesen.....	89
8. Danksagung	90
9. Tabellenverzeichnis.....	91
10. Abbildungsverzeichnis	92
6. Literaturverzeichnis.....	96

Abkürzungsverzeichnis

BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
BZ	Basalzellen
Cas-3	Caspase-3
CathD	Cathepsin D
DAB	Diaminobenzidin
EPL	Externe plexiforme Schicht
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAP43	Growth Associated Protein 43
GBZ	Globose Basalzellen
GCL	Körnerzellschicht
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GL	Glomeruläre Schicht
GSL	Glycosphingolipid, Glycosphingolipid
H.E.	Hämalaun und Eosin
HBZ	Horizontale Basalzellen
HDAC	Histon-Deacetylase
HOPS	Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting
HP β CD	2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
INP	Immediate Neuronal Precursor
Insig	Insulin-induced gene
IPL	Interne plexiforme Schicht
LAL	Lysosomale saure Lipase
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LE/L	Späte Endosomen/Lysosomen
MCL	Mitralzellschicht
Ngn1	Neurogenin1
NGS	Normal Goat Serum

NPA Niemann-Pick Typ A
NPB Niemann-Pick Typ B
NPC Niemann-Pick Typ C
OB Olfaktorischer Bulbus
OE Olfaktorisches Epithel
OEC Olfactory ensheathing cell, olfaktorische Hüllzelle
OMP Olfactory Marker Protein
ONL Olfactory nerve layer, olfaktorische Nervenfaserschicht
OR Olfaktorischer Rezeptor
ORP1L Oxysterol-binding Protein Related Protein 1L
ORP5 Oxysterol-binding Protein-related Protein
PBS Phosphate Buffered Saline, Phosphatpuffer
PFA Paraformaldehyd
PG Periglomeruläre Interneurone
RMS Rostral Migratory Stream
ROI Region of Interest
SAHA Suberoylanilid Hydroxamsäure
SC Supporting cells, Stützzellen
Scap SREBP cleavage-activating protein
SEM Standard Error Mean, Standardfehler
SGZ Subgranuläre Zone
SREBP Sterol regulatory element-binding protein
SRT Substratreduktions-Therapie
SUS Sustentacular cells, Stützzellen
SVZ Subventrikuläre Zone
TH Tyrosinhydroxylase
VNE Vomeronasales Neuroepithel
VNO Vomeronasalorgan

Zusammenfassung

Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) ist eine seltene neuroviszerale, lysosomale Lipidspeichererkrankung. Eine Loss-of-function-Mutation auf dem Chromosom 18 führt zu einer Störung des Cholesterol-Transports in den späten Endosomen und Lysosomen und einer toxischen Akkumulation von Cholesterol, Sphingomyelin, Sphingosinen und Gangliosiden. Neben der viszeralen Beteiligung von Leber, Milz und Lunge zeigt sich im Krankheitsverlauf eine fortschreitende Neurodegeneration.

NPC1 ist nicht heilbar. Miglustat (Handelsname Zavesca®) ist die bislang einzig zugelassene, krankheitsspezifische Therapieoption. Derzeit wird die Effektivität und Sicherheit eines weiteren Medikaments, HPβCD (2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin) in klinischen Studien untersucht. Auch in Kombination mit Allopregnanolon zeigten die Medikamente im Tiermodell und bei Patienten eine Reduktion der Lipidakkumulationen, eine Verzögerung der Symptome und eine Erhöhung der Lebenserwartung.

Riechstörungen treten häufig bei neurodegenerativen Erkrankungen auf. In dieser Arbeit sollten die morphologischen und immunhistochemischen Auswirkungen von NPC1 auf das olfaktorische System in einem NPC1-Mausmodell analysiert werden, insbesondere die Regenerationsfähigkeit des olfaktorischen Epithels (OE) und des Bulbus olfactorius (OB). Zusätzlich wurde der therapeutische Nutzen zweier Behandlungsstrategien (Kombi- und HPβCD-Behandlung) auf die Zellhomöostase und das neuronale Profil von OE und OB und die Funktionalität mit einem Buried Pellet Riechtest untersucht.

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 63 *Npc1*^{-/-} und 65 *Npc1*^{+/+} Mäuse in 6 verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt und im Alter von 8 Wochen morphologisch und funktionell untersucht. Die Mäuse wurden ab Tag P7 entweder mit einer synergistisch wirkenden Kombinationstherapie aus Miglustat, HPβCD und Allopregnanolon (Kombi) oder einer Monotherapie mit HPβCD allein behandelt und mit den unbehandelten *Npc1*^{-/-} und *Npc1*^{+/+} Mäusen verglichen.

Für die Morphologiestudie wurde zusätzlich ein 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU) Protokoll angewendet und die Proliferation im OE und OB qualitativ und quantitativ beurteilt. Weiterhin wurden die Immunreaktivitäten für Markerproteine der Apoptose (Caspase-3), olfaktorische Rezeptorneurone (Olfaktorisches Marker Protein), unreifes olfaktorisches Neuroepithel (GAP43), lysosomale Aktivität (Cathepsin D), dopaminerge Interneurone (Tyrosinhydroxylase), Astrocyten (GFAP) und Mikroglia (Iba1) für die verschiedenen Behandlungsgruppen analysiert. Die Riechfähigkeit wurde in einem Buried Pellet Riechtest untersucht.

Die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen im Vergleich zu den *Npc1*^{+/+} Mäusen im OE eine drastische Reduktion der reifen olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN), eine deutlich erhöhte Apoptose- und Proliferationsrate und eine gesteigerte lysosomale Aktivität. Trotz

einer unveränderten Anzahl periglomerulärer Interneurone im OB der *Npc1*^{-/-} Mäuse konnte eine deutliche Veränderung der Zellhomöostase in Form einer erhöhten Proliferations- und Apoptoseaktivität sowie massive Inflammationsprozesse nachgewiesen werden, einhergehend mit einer signifikant schlechteren Riechleistung.

Die Kombi-Behandlung zeigte im OE eine Verdopplung der neuronalen Dichte, eine deutlich erhöhte Proliferationsaktivität sowie eine signifikante Reduktion der apoptotischen Prozesse. Im OB konnte eine sichtbare Reduktion der Mikro- und Makroglia sowie der Apoptoseaktivität und eine nahezu normalisierte Zellneubildung nachgewiesen werden.

Die HPßCD-Behandlung bewirkte im OE eine Proliferationssteigerung, eine höhere neuronale Dichte und eine Reduktion der Apoptose im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen. Der therapeutische Erfolg im OB ist limitierter. Trotz normalisierter Apoptoseaktivität und sichtbar reduzierter Astroglieose kann keine Verbesserung der pathologisch gesteigerten Proliferationsaktivität und Mikroglieose nachgewiesen werden. Die Riechfunktion der *Npc1*^{-/-} Mäuse wird durch beide Behandlungen signifikant verbessert.

Zwar reduzierte die Kombi-Behandlung die Neuropathologie der *Npc1*^{-/-} Mäuse effektiver, dennoch erzielten die HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse bessere Resultate im Buried Pellet Test.

Zusammenfassend zeigen beide Therapieoptionen eine deutliche Verbesserung der Morphologie und Funktionalität des Riechsystems in einem NPC1-Mausmodell, können aber den Krankheitsfortschritt nicht vollständig aufhalten. Das olfaktorische System ist in der Lage, Veränderungen der Zellhomöostase in einem gewissen Maß zu kompensieren und neuronale Verluste durch Zellneubildung auszugleichen. Es ist ein potentieller Marker für den Krankheitsbeginn und kann als diagnostisches Mittel für die Beurteilung der Neurodegeneration sowie der Therapieerfolge eingesetzt werden.

Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Witt, M.; Thiemer, R.; **Meyer, A.**; Schmitt, O.; Wree, A. (2018)

„Main Olfactory and Vomeronasal Epithelium Are Differently Affected in Niemann-Pick Disease Type C1.“ *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3563.

Meyer, A.; Gläser, A.; Bräuer, AU.; Wree, A.; Strotmann, J.; Rolfs, A.; Witt, M. (2018)

„Olfactory Performance as an Indicator for Protective Treatment Effects in an Animal Model of Neurodegeneration.“

Front. Integr. Neurosci. 12:35. doi: 10.3389/fnint.2018.00035

Meyer, A.; Wree, A.; Günther, R.; Holzmann, C.; Schmitt, O.; Rolfs, A.; Witt, M. (2017)

„Increased Regenerative Capacity of the Olfactory Epithelium in Niemann–Pick Disease Type C1.“

Int. J. Mol. Sci. 18, no. 4: 777. <https://doi:10.3390/ijms18040777>

Hovakimyan, M.; **Meyer, A.**; Lukas, J.; Luo, J.; Gudziol, V.; Hummel, T.; Rolfs, A.; Wree, A.; Witt, M. (2013)

„Olfactory Deficits in Niemann-Pick Type C1 (*Npc1*) Disease.“

PLoS ONE 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082216>

Beiträge auf wissenschaftlichen Fachkongressen

„Cyclodextrin Treatment may Change Olfactory Receptor Expression in an Animal Model of Niemann-Pick Disease Type C1 (Npc1)“

Meyer, A.; Gläser, A.; Strotmann, J.; Bräuer, AU.; Wree, A.; Witt, M.
(AChemS 36th Annual Meeting, Bonita Springs, FL, 16. – 20.4.2018)

„Regenerative capacity of the olfactory epithelium in Niemann-Pick disease type C1 after a therapy with miglustat, cyclodextrin and allopregnanolone“

Meyer, A.; Lehmann, S.; Schmitt, O.; Wree, A.; Witt, M.
(DGNN conference 22.-24.9.2016, Hamburg)

„Electron microscopical features of Niemann-Pick disease type C1“

Witt, M.; **Meyer, A.**
(Electron Microscopy in Pathology and Medicine 2016 Spring Meeting (PANOS), Hamburg)

„Dynamic changes of olfactory and vomeronasal epithelia in Niemann Pick type C1 disease after treatment with cyclodextrin“

Witt, M.; **Meyer, A.**; Günther, R.; Lehmann, S.; Brückmann, H.; Schmitt, O.; Wree, A.
(ECRO Istanbul 1. – 5.9.2015)

„Regenerative capacity of the olfactory epithelium in Niemann-Pick disease type C1“

Meyer, A.; Günther, R.; Lehmann, S.; Brückmann, H.; Schmitt, O.; Wree, A.; Witt, M.
(Anatomische Gesellschaft Würzburg (24.- 26.9.2015))

„Regenerative capacity of olfactory mucosa in Niemann-Pick disease type C1“

Meyer, A.; Günther, R.; Lukas, J.; Rolfs, A.; Wree, A.; Witt, M.
(AChemS 36th Annual Meeting, Bonita Springs, FL, 9. – 12.4.2014)

„Olfactory deficits in Niemann-Pick-disease type C1“

Witt, M.; **Meyer, A.**; Hovakimyan, M.; Hummel, T.; Rolfs, A.; Wree, A.
(108th Annual Meeting of the Anatomical Society, Magdeburg, Germany, 22-25 of March, 2013)

1. Einleitung

Auch wenn er häufig unterschätzt wird, ist der Riechsinn für den Menschen von zentraler Bedeutung. Eine Beeinträchtigung der olfaktorischen Wahrnehmung hat einen direkten Einfluss auf das Wohlbefinden und die Lebensqualität eines Patienten. Neben der auch aus evolutionärer Sicht bedeutenden Aspekte wie der Gefahrendetektion beispielsweise bei Bränden, Gasen oder verdorbenen Lebensmitteln hat der Geruchssinn auch eine wichtige Funktion im Alltag wie zum Beispiel für die Nahrungsmittelauswahl und -genuss oder das Sozialverhalten bis hin zum Arbeitsumfeld (Croy et al. 2014).

In einer immer älter werdenden Gesellschaft wird auch die Bedeutung neurodegenerativer Erkrankungen zunehmend größer. Der Zusammenhang dieser Erkrankungen mit olfaktorischen Beeinträchtigungen ist bislang wenig untersucht, obwohl sie häufig bis zu Jahre vor den typischen Krankheitssymptomen auftreten. Beispielsweise zeigen 96% der an Morbus Parkinson erkrankten Patienten bereits Jahre vorher deutliche olfaktorische Störungen (Doty 2012; Ross et al. 2008; Hawkes et al. 1997). Morbus Alzheimer ist ebenfalls mit einer fortschreitenden olfaktorischen Beeinträchtigung assoziiert, welche sich bei rund 90% der Patienten zeigt (Djordjevic et al. 2008; Meshulam et al. 1998). Ähnliche Effekte sind auch für Morbus Huntington und andere vererbte Ataxien bekannt (Lazic et al. 2007; Barrios et al. 2007; Moberg et al. 1987).

Obwohl olfaktorische Defizite einen deutlichen Verlust der Lebensqualität bedeuten und häufig mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Karpa et al. 2010), ist das olfaktorische System, insbesondere das olfaktorische Epithel (OE) sowie der Bulbus olfactorius (OB), wenig untersucht. Dabei bietet gerade diese Region einen vielversprechenden Anhaltspunkt bei der Diagnostik und der Beobachtung des Krankheitsverlaufes.

Das olfaktorische System vereint zwei Besonderheiten. Zum einen gibt es eine direkte Verbindung zwischen zentralem und peripherem Nervensystem, wobei letzteres aufgrund der exponierten Lage direkt den Umwelteinflüssen ausgeliefert ist. Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal des olfaktorischen Systems ist seine Regenerationsfähigkeit. So werden im OB kontinuierlich neuronale Vorläuferzellen in Tyrosinhydroxylase-positive oder GABAerge Interneurone ausdifferenziert, welche zuvor aus der subventrikulären Zone (SVZ) über den RMS (rostral migratory stream) in den Bulbus migrieren (Lledo et al. 2006; Doetsch 2003; Alvarez-Buylla und García-Verdugo 2002). Zusätzlich kann auch das OE permanent olfaktorische Rezeptorneurone nachbilden (Schwob 2002; Altman 1969; Mackay-Sim et al. 2015). Auch nach Verletzungen zeigt das olfaktorische System eine hohe Plastizität (Loo et al. 1996; Graziadei und Graziadei 1979; Carr und Farbman 1993).

Diese Eigenschaften machen das olfaktorische System zu einem möglichen Anfangspunkt neurodegenerativer Prozesse und folglich zu einem potentiellen diagnostischen Tool. In dieser Arbeit soll daher die Plastizität des olfaktorischen Systems in einem Niemann-Pick Typ C1 Mausmodell sowie der Einfluss zwei verschiedener Behandlungsstrategien untersucht werden.

1.1. Olfaktorische Wahrnehmung

Der Riechsinn ist ein chemischer Sinn, bei dem die Duftstoffe der Atemluft über eine komplexe Signalkaskade detektiert, verarbeitet und interpretiert werden. Daran beteiligt sind sowohl periphere als auch zentrale olfaktorische Strukturen. Hierzu zählen das olfaktorische Epithel (OE), der Bulbus olfactorius (OB), der Tractus olfactorius, welcher über die Stria olfactoria lateralis in weitere zentrale Hirnregionen projiziert.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem OE und dem OB, welche im Folgenden näher vorgestellt werden.

1.1.1. Olfaktorisches Epithel

Das olfaktorische Epithel (OE) bildet zusammen mit der Lamina propria die Riechschleimhaut (Abbildung 1). Dabei setzt sich das mehrreihige OE aus drei verschiedenen Zellschichten zusammen: den Basalzellen (BZ), den olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) und den Stützzellen (SZ).

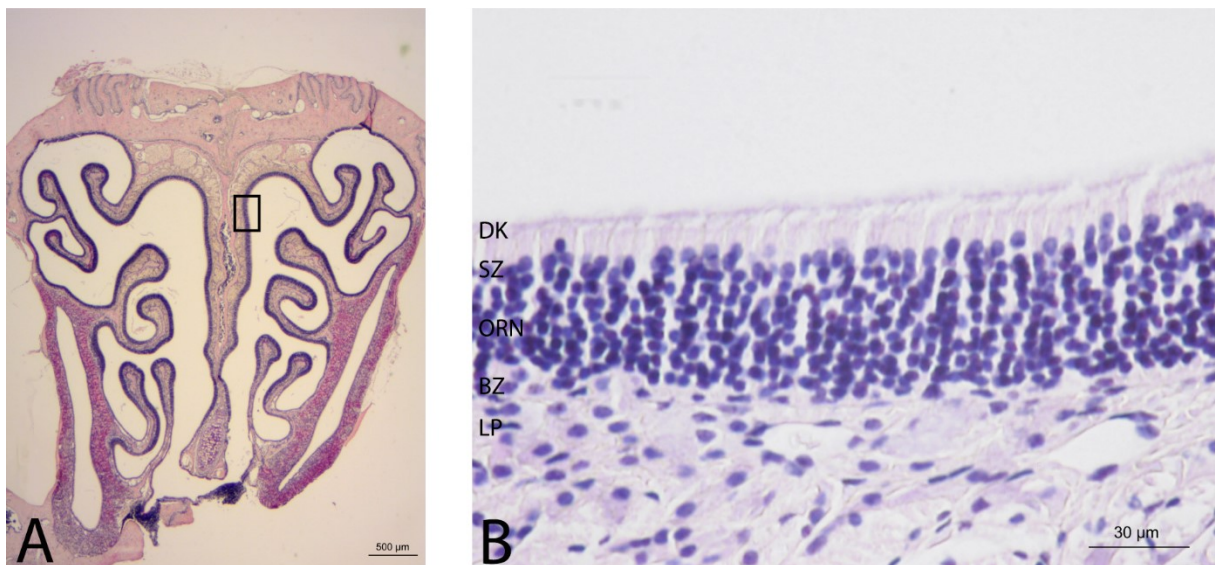


Abbildung 1 Strukturelle Übersicht des OE (H.E.-Färbung) (A) Frontalschnitt der Nasenhöhle einer 56 Tage alten *Npc1*^{+/+} Maus (Skalierungsbalken entspricht 500µm) **(B)** Querschnitt durch die Riechschleimhaut mit der Lamina propria (LP) und dem OE. Das OE zeigt einen mehrreihigen Aufbau aus Basalzellen (BC), olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) und Stützzellen (SC). Die ORN ragen mit ihrem mit Zilien besetzten dendritischen Kopf (DK) in den luminalen Bereich der Nasenhöhle. (Skalierungsbalken entspricht 30µm)

Basalzellen

Die basale Schicht des OE besteht aus horizontalen (HBZ) und globosen Basalzellen (GBZ), welche als Stamm- und Vorläuferzellen fungieren und somit für die Regeneration der zweiten wichtigen Zellpopulation verantwortlich sind, den olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN). Die GBZ unterscheiden sich bereits morphologisch von den HBZ. Die HBZ liegen flach auf der Basallamina, während die GBZ eine runde Zellform aufweisen und direkt auf den HBZ aufliegen (Iwai et al. 2008; Beites et al. 2005).

Die GBZ werden direkt mit einer aktiven Proliferation in Verbindung gebracht. Sie teilen sich asymmetrisch, um zum einen eine gewisse Anzahl an teilungsfähigen Stammzellen aufrecht zu erhalten und zum anderen, um eine Population von sich schneller teilenden neuronalen Vorläuferzellen zu bilden (Abbildung 2, links). Man unterscheidet zwei Typen von Vorläuferzellen, den Mash1 und den Neurogenin1 (Ngn1) exprimierenden Progenitorzellen, wobei Mash1(+) Zellen direkt aus den Stammzellen generiert werden und die Ngn1(+) Zellen die Tochterzellen der Mash1(+) Zellen sind (Calof et al. 2002; Gordon et al. 1995; DeHamer et al. 1994). Die Ngn1(+) Zellen werden auch als immediate neuronal precursor (INP) bezeichnet und können sich zu ORN ausdifferenzieren, welche in Abhängigkeit vom Differenzierungsprozess durch verschiedene Marker spezifizieren lassen (Calof et al. 2002; Pixley 1992; Calof und Chikaraishi 1989; Margolis 1982). Darüber hinaus können sie auch nicht-neuronale Zellen regenerieren wie den Stützzellen oder den olfaktorischen Hüllzellen (OEC, olfactory ensheathing cell) in der Lamina propria (Goldstein und Schwob 1996; Calof und Guevara 1993). HBZ hingegen teilen sich nur sehr selten und exprimieren keine neuronalen Marker, weswegen ihnen lange eine unterstützende Funktion zugesprochen wurde, ähnlich den Ependymzellen in der SVZ (Beites et al. 2005; Chiasson et al. 1999; Doetsch et al. 1997). Neuere Studien hingegen konnten nachweisen, dass sowohl die GBZ als auch die HBZ multipotente Vorläuferzellen umfassen, jedoch unter unterschiedlichen Voraussetzungen agieren. Während der normale Zellumsatz durch die GBZ ausreichend ausgeglichen werden kann, werden die sonst überwiegend inaktiven HBZ erst bei massiveren Schädigungen wie nach Läsionen mit Methylbromid beansprucht (Iwai et al. 2008; Leung et al. 2007). Dabei können sie sich sowohl selbst erneuern, als auch in GBZ differenzieren, welche wiederum möglicherweise in ORN ausdifferenzieren (Abbildung 2). Darüber hinaus beteiligen sie sich auch an nicht-neuronalen Zellpopulationen wie den Stützzellen oder den Bowman-Drüsen (Iwai et al. 2008).

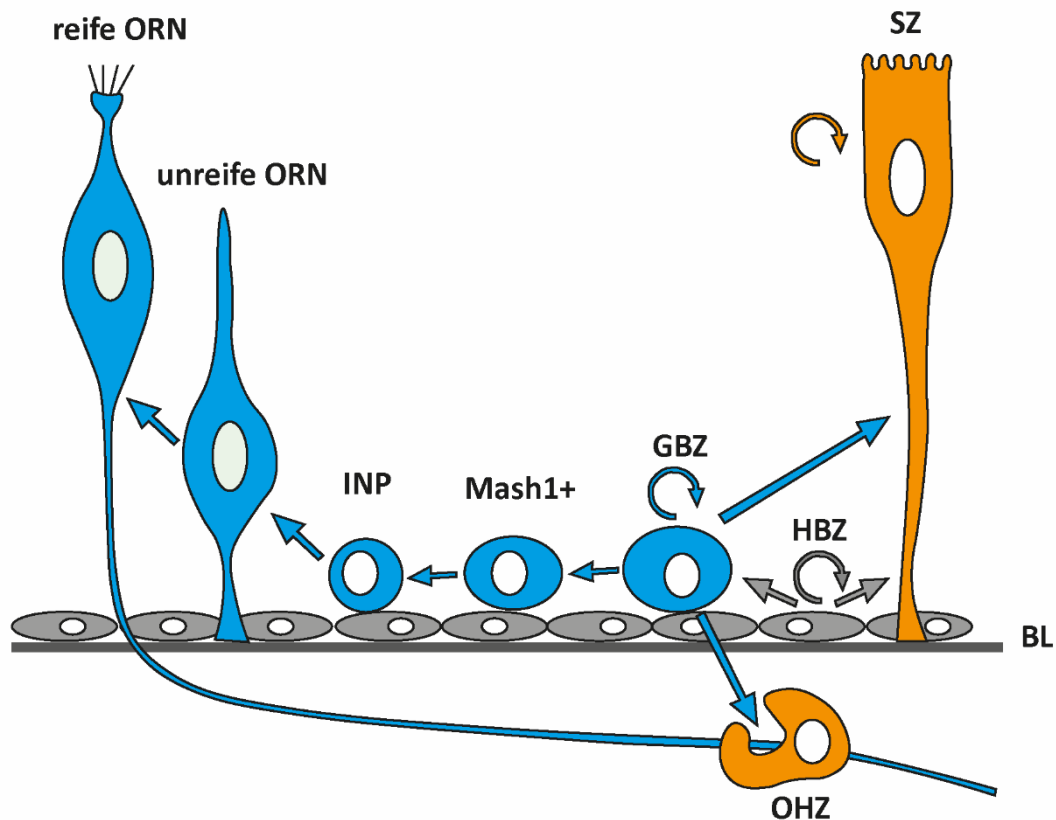


Abbildung 2 Vereinfachtes Modell der Neurogenese und Differenzierung im OE. (Abbildung modifiziert nach Beites et al. 2005 und Iwai et al. 2008): Globöse Basalzellen (GBZ) im OE können Mash1(+) Zellen produzieren, welche wiederum INP-Zellen (immediate neuronal precursor) generieren und zu olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) ausdifferenzieren können. Weiterhin können sie aber auch nicht-neuronale Zellen ersetzen wie die olfaktorischen Hüllzellen (OHZ) und die Stützzellen (SZ). Horizontale Basalzellen (HBC) können sich selbst erneuern oder zu globösen Basalzellen (GBC) und somit auch weiter zu ORN differenzieren. Weiterhin können sie Stützzellen regenerieren. Sowohl die GBZ als auch die HBZ können Neurone generieren.

Olfaktorische Rezeptorneurone

Die überwiegende Mehrheit des OE wird aus säulenartig angeordneten ORN gebildet. Diese ersten Neurone der Riechbahn sind bipolare Zellen, welche auf der basalen Seite mit einem zum OB projizierenden Axon enden und auf der apikalen Seite einen mit sensorischen Zilien besetzten dendritischen Kopf besitzen. Hier findet die sensorische Transduktion statt. Dabei bindet ein Geruchsmolekül an einen olfaktorischen Rezeptor (OR) und aktiviert dadurch ein olfaktorisches G-Protein, welches über einen cAMP-vermittelten Transduktionsweg eine Depolarisation bedingt und zum Aufbau eines Rezeptorpotenzials führt (Mombaerts 2006).

In Abhängigkeit von der Differenzierung exprimiert jedes ORN nur ein einziges Rezeptorgen. ORN mit dem gleichen OR sind dabei scheinbar regelmäßig im OE verteilt,

wobei ihre Axone in den selben Glomerulus im OB projizieren und so die ausgelösten Aktionspotenziale weiterleiten (Mombaerts 2006).

Aufgrund der exponierten Lage und den ständig beanspruchenden Umwelteinflüssen ist die Lebensdauer der ORN begrenzt. Die durchschnittliche Lebensdauer reifer ORN wird zwischen 30 und 90 Tagen angegeben (Mackay-Sim und Kittel 1991; Graziadei und Graziadei 1979; Moulton 1974) und kann ebenso mehr als 12 Monate betragen (Holl 2018).

Da das OE nur diesen einen Neuronentyp aufweist, ist die Charakterisierung der verschiedenen Differenzierungsstadien deutlich einfacher als bei komplexeren neuronalen Strukturen und bietet daher ein ideales Objekt für Studien der adulten Neurogenese und des Regenerationsverhaltens.

Stützzellen

Die dritte Zellpopulation im OE sind die nicht-neuronalen Stützzellen (SZ, supporting cells, SC; sustentacular cells, SUS), welche eine einzellige Schicht an der apikalen Oberfläche des OE bilden (Abbildung 1) und durch dünne zytoplasmatische Fortsätze mit der Basallamina verbunden sind.

Neben der Möglichkeit, aus den basalen Stammzellen regeneriert zu werden (siehe Kapitel „Basalzellen“), können sie sich auch selbst erneuern. Analog zu den Gliazellen des ZNS haben auch die Stützzellen eine unterstützende Funktion, beispielsweise durch die Detoxifizierung schädlicher Substanzen in der Atemluft durch verschiedene Enzyme wie Cytochrom P-450, Glutathion-S-Transferasen oder Carbonylreduktasen (Yu et al. 2005). Weiterhin können sie auch abgestorbene ORN phagozytieren und bilden eine Art Stützgerüst sowie elektrische Isolation für diese (Weiler und Farbman 1998; Suzuki et al. 1996; Getchell et al. 1984).

Lamina propria

Die Lamina propria (LP) besteht aus Bindegewebe, Blutgefäßen und den Bowman-Drüsen (Glandulae olfactoriae), welche den Riechschleim auf der luminalen Seite des OE sezernieren, um darin die Geruchsmoleküle über spezifische Proteine (odorant-binding proteins) auf den Zilien zu binden und die Oberfläche des OE gleichzeitig vor Austrocknung und Xenobiotika zu schützen (Pelosi et al. 2014).

Weiterhin befinden sich die olfaktorischen Hüllzellen (OEC, olfactory ensheathing cells) in der LP, welche die Axone der ORN zu Fila olfactoria zusammenfassen, umhüllen und durch die Siebplatte zum entsprechenden Glomerulus im OB leiten. Sie ähneln in ihrer Funktion damit den Astrozyten und den Schwann-Zellen, können darüber hinaus aber auch demyelinisierte Axone wiederherstellen und haben somit eine neuroprotektive und

immunmodulatorische Funktion (Khankan et al. 2016; Barnett und Riddell 2004; Au und Roskams 2003). Die Fila olfactoria werden als paarig angelegter Riechnerv (Nervus olfactorius, 1. Hirnnerv) gebündelt und zum OB weitergeleitet.

1.1.2. Bulbus olfactorius

Der Bulbus olfactorius (OB) ist ein paarig angelegter Bereich des ZNS und die erste Gehirnregion, welche die über das OE detektierten Geruchsinformationen verarbeitet und zum olfaktorischen Cortex weiterleitet. Seinen Namen erhielt der OB aufgrund seines zwiebelschalenartigen Aufbaus. Man unterscheidet dabei von außen nach innen sechs Schichten (Abbildung 3): die olfaktorische Nervenfaserschicht (ONL), die glomeruläre Schicht (GL), die externe plexiforme Schicht (EPL), die Mitralzellschicht (MCL), die interne plexiforme Schicht (IPL) und die Körnerzellschicht (GCL) im Zentrum des OB. Im Gegensatz zum OE findet man im OB fünf verschiedene Neuronentypen. Dazu gehören die Mitral- und Büschelzellen, die periglomerulären Zellen, short axon Zellen und die Körnerzellen.

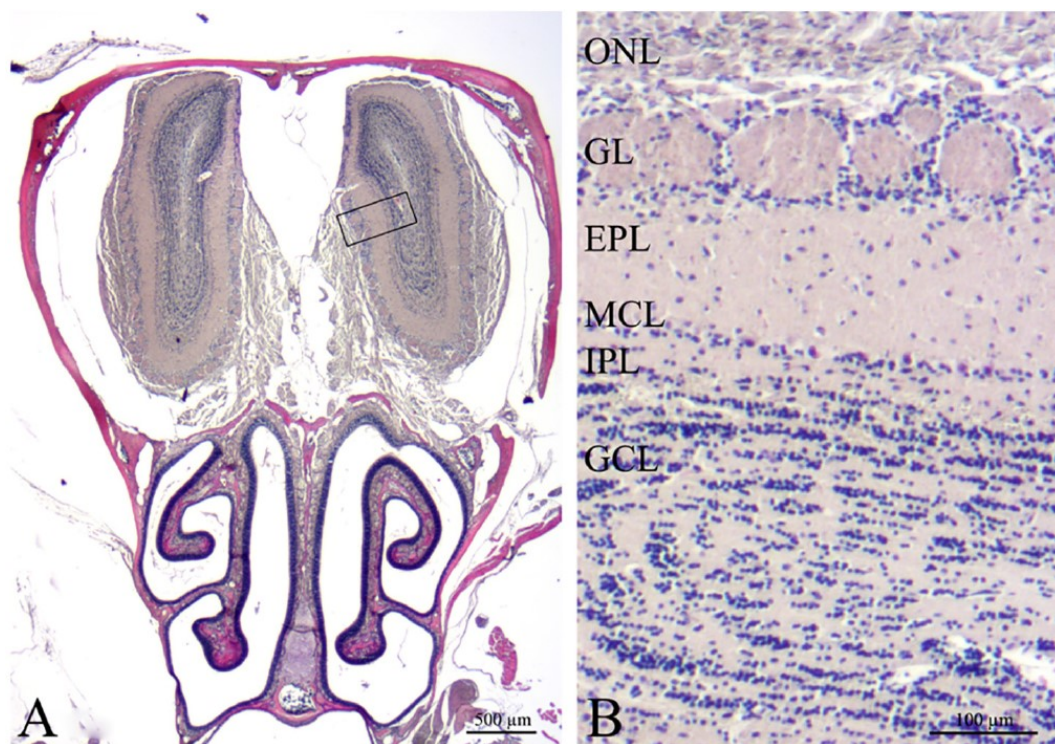


Abbildung 3 Histologischer Überblick der peripheren und zentralen olfaktorischen Strukturen. (A) Frontalschnitt der vorderen Schädelhöhle einer Maus zeigt den paarigen Bulbus olfactorius (OB) und die Nasenhöhle mit den mit Riechschleimhaut ausgekleideten Nasenmuscheln und Septum. (Skalierungsbalken entspricht 500µm) (B) Querschnitt des OB mit den sechs Schichten: die olfaktorische Nervenfaserschicht (ONL), die glomeruläre Schicht (GL), die externe plexiforme Schicht (EPL), die Mitralzellschicht (MCL), die interne plexiforme Schicht (IPL) und die Körnerzellschicht (GCL). (Skalierungsbalken entspricht 100µm) (aus Meyer et al. 2018).

Adulte Neurogenese

Im adulten Säugetier gibt es nur zwei Regionen, in denen fortlaufend Neurone generiert werden. Dies ist zum einen die subgranuläre Zone (SGZ) des im Hippocampus befindlichen Gyrus dentatus und zum anderen die SVZ, deren Stammzellen für den neuronalen Ersatz des OB verantwortlich sind (Lledo et al. 2006; Alvarez-Buylla und García-Verdugo 2002).

Die in der SVZ befindlichen Astrozyten agieren hierbei als neuronale Stammzellen und produzieren täglich mehr als 30.000 Neuroblasten, welche über den RMS (rostral migratory stream) tangential und durch Astrozyten geleitet in Richtung OB migrieren (Alvarez-Buylla et al. 2001; Jankovski und Sotelo 1996; Lois und Alvarez-Buylla 1994). Im OB angekommen migrieren sie radial und differenzieren zu inhibitorischen GABAergen Interneuronen, den Körnerzellen und den periglomerulären Zellen (PG) (Sequerra 2014; Lledo et al. 2006; Lois und Alvarez-Buylla 1994). Dabei können nur rund 50% der neugebildeten Zellen den Migrations-, Differenzierungs- und Ausreifungsprozess tatsächlich erfolgreich beenden und leben länger als einen Monat (Carleton et al. 2003; Dayer et al. 2003; Winner et al. 2002). Die Körnerzellen und PG bilden mit den Projektionsneuronen, den Mitral- und Büschelzellen, reziproke dendrodendritische Synapsen, um so die zentral geleiteten Geruchsinformationen zu kontrollieren. Dabei werden die Körnerzellen durch die Mitral- bzw.- Büschelzellen angeregt und bewirken dadurch eine GABAerge Hemmung desselben oder eines benachbarten Projektionsneurons (Lledo und Valley 2016).

Periglomeruläre Zellen

Die periglomerulären Zellen (PG) befinden sich in direkter Umgebung der Glomeruli und können in Abhängigkeit ihrer synaptischen Verbindungen und ihrer Botenstoffe unterteilt werden. PG können entweder GABAerg oder dopaminerg sein, wobei eine Subpopulation beide Botenstoffe exprimieren kann. Weiterhin können sie direkt mit den Axonen der ORN und den Projektionsneuronen Synapsen oder ausschließlich mit den Mitral- und Büschelzellen bilden (Whitman und Greer 2009; Kosaka und Kosaka 2005; Kosaka et al. 1998). Damit beeinflussen sie maßgeblich die inhibitorischen und exzitatorischen Kreisläufe innerhalb der Glomeruli.

Mitral- und Büschelzellen

Die Mitralzellen sind Projektionsneurone und befinden sich in der gleichnamigen Mitralzellschicht. Sie haben einen apikalen Dendriten, der sich innerhalb eines Glomerulus verzweigt und weitere laterale Dendriten in der EPL. Ihre Axone projizieren über den Tractus olfactorius zum piriformen Cortex (Walz et al. 2006; Price und Powell 1970). Eine Mitralzelle

erhält dabei alle Afferenzen eines Glomerulus und führt damit die Informationen des gleichen OR weiter. Sie kann sich weiterhin auch mit benachbarten Mitralzellen desselben Glomerulus verknüpfen und wird durch die PG und Körnerzellen moduliert (Christie et al. 2005). Mitralzellen werden im Gegensatz zu den Interneuronen nur bis zum 30. Lebensstag morphologisch und physiologisch vollständig ausgebildet und werden nicht regeneriert (Blanchart et al. 2006; Devor 1976).

Neben den Mitralzellen gibt es mit den Büschelzellen noch einen zweiten Typ von Projektionsneuronen im OB. Diese befinden sich überwiegend in der EPL, können sich aber auch innerhalb eines Glomerulus befinden, wo sie dann wahrscheinlich nur innerhalb des Bulbus agieren (Wachowiak und Shipley 2006). Während die apikalen Dendriten der Büschelzellen sich ähnlich wie die der Mitralzellen innerhalb eines Glomerulus verzweigen, bleiben die lateralen überwiegend in der oberen Schicht der EPL nahe der GL und orientieren sich dabei in unterschiedlichen Schichten (Mori et al. 1983; Macrides und Schneider 1982).

Innerhalb eines Glomerulus werden die Axone der ORN mit ca. 10 – 30 Mitralzellen und 50 – 80 Büschelzellen verschaltet (Shipley et al. 2004; Shepherd 1972).

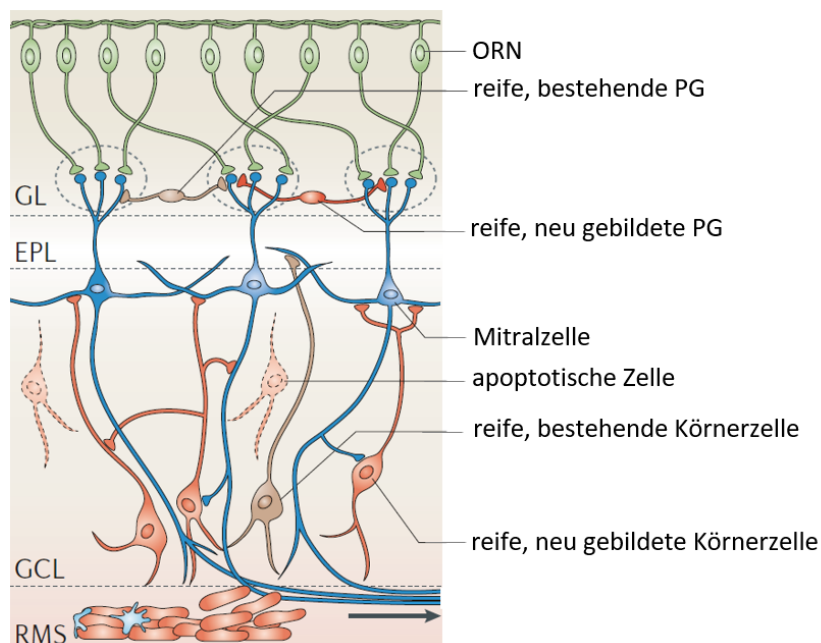


Abbildung 4 Verschaltung der Projektions- und Interneurone im OB. Die in der SVZ gebildeten Neuroblasten migrieren über den rostral migratory stream (RMS) tangential zum OB und breiten sich vom Zentrum radial in die verschiedenen Schichten des OB aus. Dort differenzieren sie in entweder in Körnerzellen oder periglomeruläre Zellen (PG) aus. Durch synaptische Verknüpfungen mit den Büschel- und Mitralzellen modulieren sie die Weiterleitung der einkommenden Signale der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN). (Abbildung modifiziert aus Lledo et al. 2006).

Körnerzellen

Die größte Zellpopulation im OB wird von den Körnerzellen gebildet, welche sich im Zentrum des OB, der Körnerzellschicht, befinden. Die Besonderheit der Körnerzellen liegt darin, dass sie keine Axone besitzen, jedoch dendritische Ausläufer bilden, die bis in die EPL reichen und sich dort verzweigen. Je nach Lokalisation können verschiedene Subtypen unterschieden werden. Während die tiefer gelegenen Körnerzellen überwiegend mit den lateralen Dendriten der Mitralzellen interagieren, bilden die höher gelegenen vorwiegend Synapsen mit den Büschelzellen. Eine weitere dritte Subpopulation verzweigt sich auch weit über die EPL hinaus (Imamura et al. 2006; Greer 1987; Orona et al. 1984; Mori et al. 1983).

Short axon Zellen

Ein weiterer neuronaler Zelltyp im OB sind die short axon Zellen, welche sich in Abhängigkeit des Neurotransmitters und der Lage unterteilen lassen. Während sich die GABAergen short axon Zellen in der Körnerzellschicht befinden, sind die glutamatergen in der GL. Ähnlich wie die Körnerzellen modulieren sie die Projektionsneurone (Shipley und Ennis 1996). Ihre Axone werden über der Tractus olfactorius weitergeleitet (Kosaka und Kosaka 2010).

1.2. Morbus Niemann-Pick Typ C1

Morbus Niemann-Pick ist eine seltene, bislang nicht heilbare und sehr heterogene Lipidspeichererkrankung, welche autosomal-rezessiv vererbt wird und in bis zu 4 Subtypen A – D unterschieden werden kann (Crocker und Farber 1958). Während beim Morbus Niemann-Pick Typ A (NPA) und Typ B (NPB) ein Gendefekt auf dem Chromosom 11 zu einem Mangel der sauren, lysosomalen Sphingomyelinase und folglich in einer toxischen Akkumulation von Sphingomyelin und anderen Lipiden resultiert (Brady et al. 1966), führt bei Morbus Niemann-Pick Typ C (NPC) ein Defekt auf dem Chromosom 18 zu einer Störung des Cholesterol-Transports in den späten Endosomen und Lysosomen.

Patienten des Typ A zeigen eine schwere neuroviszerale Beteiligung, u.a. mit einer ausgeprägten Hepatosplenomegalie und fortschreitender Neurodegeneration und einer drastisch reduzierten Lebenserwartung von bis zu 3 Jahren. Patienten des Typ B erleben häufig das Erwachsenenalter und zeigen eine chronische viszerale Beteiligung, typischerweise in Milz, Leber und Lunge, aber keine oder deutlich mildere neurologische Symptome (Wasserstein et al. 2006). Patienten des Typ C zeigen eine subakute neurologische Beteiligung, eine weniger ausgeprägte Organomegalie als Typ A und generell einen langsameren Verlauf (Vanier und Millat 2003; Garver et al. 2007). Dennoch ist die Konzentration von Cholesterol und Sphingomyelin bei NPC-Patienten deutlich höher als bei NPA oder NPB Patienten (Walkley und Vanier 2009).

Niemann-Pick Typ C ist panethnisch und wird mit einer Prävalenz von 1/120.000 bis 1/150.000 angegeben, wobei die Angaben aufgrund der Heterogenität der Krankheit und der folglich erschwerten Diagnostik schwanken (Vanier und Millat 2003; Vanier 2010). Je nach Lokalisation der Genmutation unterscheidet man dabei zwischen Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) und Typ C2 (NPC2), wobei NPC1 mit 95% deutlich häufiger auftritt als NPC2 (5%). Durch eine Loss-of-function-Mutation auf einem dieser beiden Gene akkumulieren Cholesterol, Sphingomyelin, Sphingosine und Ganglioside (GM2 und GM3) in toxisch wirkendem Ausmaß (Peake und Vance 2010).

Der weitere Niemann-Pick Typ D (Nova Scotia Typ) wird inzwischen zum Subtyp NPC1 gezählt, nachdem nachgewiesen wurde, dass es sich bei dieser Mutation um eine Allel-Variante auf demselben Gen handelt (Greer et al. 1998).

1.2.1. Ätiologie von Niemann-Pick Typ C

Ursache der NPC-Erkrankung ist in 95% der Fälle eine Loss-of-function-Mutation des NPC1-Gens auf dem Chromosom 18q11, welches ein transmembranöses, spätendosomales/lysosomales (LE/L) Transportprotein für große wasserunlösliche Moleküle kodiert (Peake und Vance 2010; Carstea et al. 1997). Bei den restlichen 5% der NPC-Patienten liegt eine Mutation des NPC2 Gens auf dem Chromosom 14q24.3 vor, einem

kleinen, löslichen, lysosomalen Transportprotein mit einer hohen Cholesterol-Bindungsaffinität (Dixit et al. 2011; Storch und Xu 2009; Vanier und Millat 2004; Naureckiene et al. 2000). Eine Mutation des NPC1 oder NPC2 Gens bedingt eine Störung im Transport verschiedener Lipide von den späten Endosomen/ Lysosomen zum endoplasmatischen Retikulum (ER), einschließlich des endozytotisch aufgenommenen Cholesterols, und folglich eine neuroviszerale Akkumulation von unverestertem Cholesterol, Glykolipiden, Glykosphingolipiden (GSL) und Fettsäuren, wobei die genaue Funktion der beiden betroffenen Proteine nicht vollständig geklärt ist.

Cholesterol ist für den menschlichen Organismus essentiell. Unter anderem ist es Bestandteil nahezu aller Zellmembranen und notwendig für die Membranfluidität bzw. –stabilität, für Zellsignale, als Vorstufe von Steroidhormonen und für die Gallensäuren (Simons und Ikonen 1997). Die Zellen können die Cholesterol synthese zum einen selbst im ER über verschiedene Proteine wie SREBP (sterol regulatory element-binding protein), Scap (SREBP cleavage-activating protein) bei zu geringen, Insig (Insulin-induced gene) bei ausreichenden oder übermäßigen und Erln-1 und -2 bei zu hohen Cholesterol-Konzentrationen steuern oder in Verbindung mit Apolipoproteinen in Form von Low-Density Lipoproteinen (LDL) endozytotisch aufnehmen (Howe et al. 2016). Abbildung 5 veranschaulicht den NPC1/NPC2-abhängigen Cholesterol-Transport. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft des Cholesterols liegt dieses im Endosom in Form von LDL vor und wird durch die lysosomale saure Lipase (LAL) unter Freisetzung von unverestertem Cholesterol und Fettsäuren hydrolysiert. Dieses freie Cholesterol wird von dem löslichen NPC2 aufgenommen und zum transmembranösen NPC1 Protein transportiert, wo es von der lysosomalen auf die zytosolische Seite freigesetzt und in Verbindung mit ORP5 (oxysterol-binding protein-related protein) zur ER-Membran transportiert werden kann (Peake und Vance 2010; Neefjes und van der Kant 2014). Der Transport und die Hydrolyse von LDL selbst scheint bei NPC1 jedoch nicht betroffen zu sein (Pentchev et al. 1985).

Zu hohe Cholesterolkonzentrationen wirken toxisch. Für den Erhalt der Cholesterolhomöostase bedarf es eines komplexen Systems aus einer Vielzahl verschiedener Proteine, welche die schwankenden Cholesterol-Konzentrationen detektieren und darauf reagieren können. Der Transport der LE kann bidirektional erfolgen, entweder durch die Aktivierung des Kinesin- oder Dynein-Motors. Der Großteil des zellulären Cholesterols befindet sich in der Plasmamembran und wird dabei von ORP1L (oxysterol-binding protein related protein 1L) überwacht, welches in Kombination mit RAB7/RILP (RAB7 interacting lysosomal protein) den Dynein-Motor für den retrograden Transport steuert. In Verbindung mit dem HOPS (Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting) –Komplex wird wiederum die Richtung des Transports und die Fusion der LE und Lysosomen reguliert (Neefjes und van der Kant 2014).

Im Fall eines NPC1-Defizits oder einer Mutation akkumuliert das Cholesterol in der LE-Membran, welches zu einem gestörten Lipidtransport führt, wobei es phänotypisch keinen Unterschied macht, welches der beiden Gene tatsächlich betroffen ist (Sleat et al. 2004).

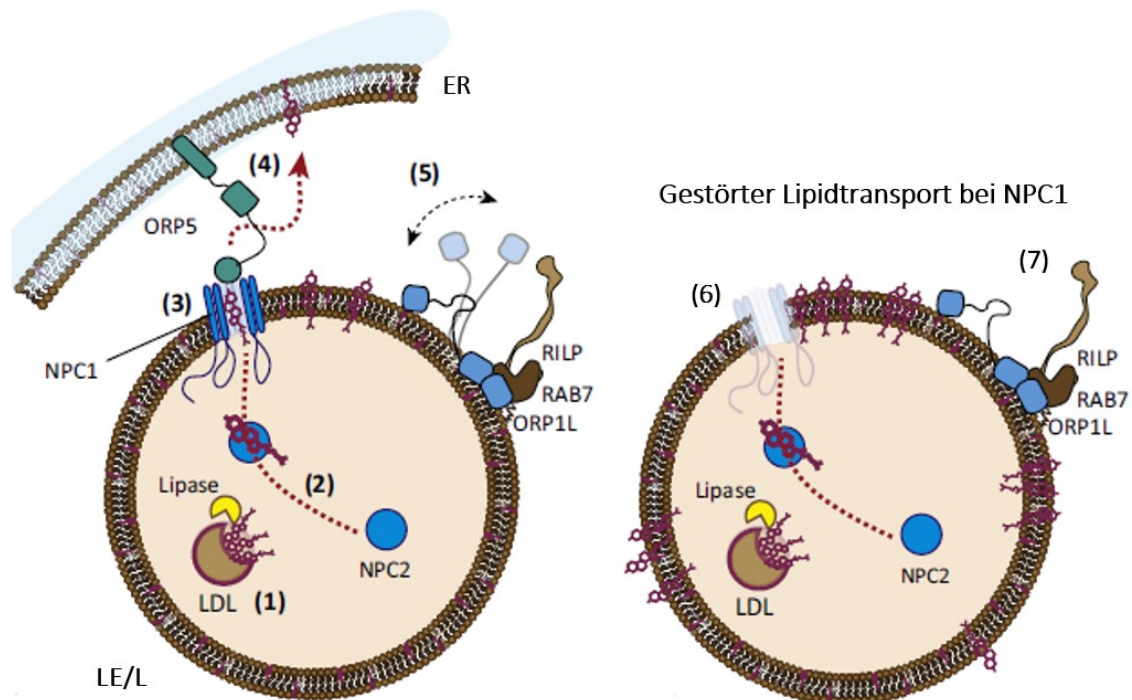


Abbildung 5 Möglicher Mechanismus des NPC1/NPC2-abhängigen Cholesterol-Transports. Das in Form von LDL endozytotische aufgenommene Cholesterol wird durch eine Lipase hydrolysiert (1). Das dadurch freigesetzte unveresterte Cholesterol wird über das NPC2-Protein zum membranständigen NPC1-Protein transportiert (2). Dort wird es von der lysosomalen auf die zytosolische Seite (3) und mithilfe von ORP5 zum endoplasmatischen Retikulum transportiert (4). Das membrangebundene Cholesterol wird dabei über ORP1L detektiert und der weitere Transport durch einen RAB7/RILP-Komplex gesteuert (5). Eine NPC1-Defizienz (6) resultiert in einer toxischen Akkumulation von unverestertem Cholesterol in der LE/L Membran und einem gestörten Lipidtransport (7). (Details siehe Text, Abbildung modifiziert aus Neefjes und van der Kant 2014)

NPC1-Patienten zeigen nicht nur signifikant erhöhte Konzentrationen von Cholesterol, sondern weiterhin auch von anderen Lipiden wie Glycosphingolipiden (GSL), insbesondere Glycosylceramide, Sphingomyelin, Sphingosine und Ganglioside (GM2 und GM3) (Vanier 2015). Dabei ist die Verteilung je nach Art des Gewebes unterschiedlich. So findet man in der Leber und der Milz überwiegend unverestertes Cholesterol, Sphingomyelin, Sphingosin und GSL (Vanier 2010; Patterson et al. 2000; Zervas et al. 2001a). Dieses Lipidmuster zeigt sich auch in NPC Mäusen oder NPC Katzen, wobei die Lipidwerte in den Tiermodellen in der Leber grundsätzlich höher sind als in der Milz und damit eine gegenteilige Tendenz zu den Patienten zeigen (Vanier 2010). Im Gegensatz zur Peripherie zeigen neuronale Strukturen sowohl bei NPC Patienten als auch in den Tiermodellen keinen offensichtlichen Anstieg von Sphingomyelin oder Cholesterol. Stattdessen dominieren von GM2 und GM3 mit einer mehr als zehnfach höheren Konzentration und die GSL: Glycosylceramide, Lactosylceramide und Gangliosylceramide (Vanier 2015; Pentchev et al. 1980; Vanier 2010).

Zusätzlich zu den Lipidakkumulationen ist auch die Beteiligung von Oxysterolen ein möglicher Aspekt der NPC1-Pathologie, welche eine wichtige Funktion in der Regulation der Cholesterol-Synthese einnehmen und mit zunehmender Cholesterolkonzentration ansteigen (Howe et al. 2016). Porter et al. wiesen in einem NPC1 Mausmodell bereits vor

dem Beginn der Krankheitssymptome sowohl in der Leber als auch im Hirn und im Plasma erhöhte Werte von nicht-enzymatisch gebildeten Cholesterol-Oxidationsprodukten nach, welche zusätzlich mit fortschreitendem Krankheitsverlauf anstiegen und durch therapeutische Maßnahmen reduziert wurden. Folglich ist das Oxysterol-Profil ein potentieller Biomarker für die Diagnose und Therapie von NPC1 (Porter et al. 2010).

1.2.2. Klinischer Verlauf

NPC1 gehört zu den seltenen Lipidspeichererkrankungen und zeigt einen außerordentlich heterogenen klinischen Verlauf, wodurch eine richtige Diagnose zunehmend erschwert wird. Der Krankheitsbeginn ist sehr variabel und reicht vom Neugeborenen- bis hin zum Erwachsenenalter mit bis zu über 60 Jahre. Ähnlich heterogen verteilt sich auch die Lebenserwartung mit nur wenigen Tagen bis zu mehr als 60 Jahre, wobei die Mehrzahl der Patienten nicht älter als 10 – 25 Jahre alt wird (Vanier und Millat 2003; Spiegel et al. 2009; Vanier 2010; Trendelenburg et al. 2006). Der Beginn der viszeralen Beteiligung von Leber, Milz und Lunge unterscheidet sich dabei auch vom Beginn der neurologischen oder psychiatrischen Symptome und tritt für gewöhnlich früher auf, wobei 90% der Patienten eine progressive Neurodegeneration aufweisen (Vanier 2015). Dies macht sich typischerweise durch Symptome wie zerebelläre Ataxie, Dysarthrie, Dysphagie und fortschreitende Demenzercheinungen sowie Kataplexie, Krampfanfälle und Dystonie bemerkbar (Vanier 2010). Häufig zeigt sich auch eine charakteristische supranukleäre Blickparese (Solomon et al. 2005) sowie eine Hepatosplenomegalie, wobei diese mit der Zeit abnimmt bzw. bei rund 15% der Patienten gar nicht auftritt. Weiterhin konnten bei NPC-Patienten auch Veränderungen des Zytoskeletts in Form von neurofibrillärer Bündel nachgewiesen werden, welche aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen und auch ein charakteristisches neuropathologisches Merkmal bei Morbus Alzheimer sind, vermutlich aber aufgrund des gestörten Cholesterolstoffwechsels gebildet werden (Suzuki et al. 1995).

Abbildung 6 veranschaulicht die systemische und neurologische Beteiligung in Abhängigkeit vom Krankheitsbeginn noch einmal (Vanier 2010).

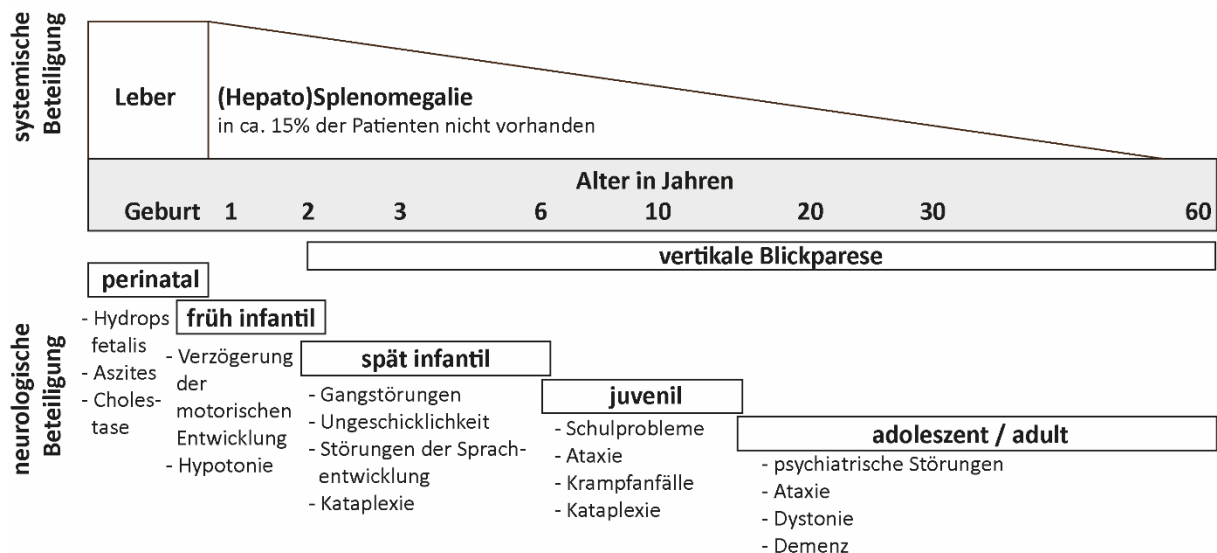


Abbildung 6 Systemische und neurologische Beteiligung bei NPC. Schematische Darstellung der verschiedenen Formen von NPC, dem Krankheitsbeginn und der typischen Symptome. Die Darstellung zeigt die Heterogenität der Krankheit. (modifiziert nach Patterson et al. 2012, Vanier 2010)

Je nach Alter und Art der klinischen Symptomatik lässt sich NPC1 in eine perinatale, eine frühe infantile Periode von 2 Monaten bis 2 Jahren, eine späte infantile Periode von 2 bis 6 Jahren, eine juvenile Periode von 6 bis 15 Jahren und eine adoleszente/adulte Phase unterscheiden. Die häufigste Form ist dabei die juvenile Form. In diesen Fällen wurde häufig vorher eine moderate Splenomegalie oder Hepatosplenomegalie festgestellt, wobei 10% der Fälle keine Auffälligkeiten zeigen. Neben Aufmerksamkeits- und Schreiebschwierigkeiten ist die vertikale Blickparese eines der prägnantesten Symptome. Neben zunehmender motorischer Beeinträchtigungen zeigt mehr als die Hälfte der jungen Patienten Krampfanfälle und Spastiken. Die Lebenserwartung ist sehr unterschiedlich, kann aber über das 30. Lebensjahr hinausgehen.

Grundsätzlich lässt sich zusammenfassen, dass der Beginn der systemischen Symptome viele Jahre früher auftreten kann und nicht in direktem Zusammenhang mit den neurologischen Symptomen steht. Andererseits ist der neurologische Krankheitsbeginn durchaus ausschlaggebend für den weiteren Krankheitsverlauf und die Lebenserwartung (Vanier 2010).

1.2.3. Diagnostik

Aufgrund des sehr unterschiedlichen Krankheitsbeginns und der Heterogenität der Symptome ist die Diagnose von NPC1 erschwert. Um die Detektion zu erleichtern, wurde ein NPC-Verdachtsindex entwickelt, der die viszerale, neurologischen und psychiatrischen Anzeichen unter Berücksichtigung der Familienanamnese bewertet (Wijburg et al. 2012).

Aufgrund der Ähnlichkeit der systemischen und neurologischen Symptome ist eine Abgrenzung von anderen Erkrankungen von hoher Bedeutung beispielsweise von anderen angeborenen Stoffwechselerkrankungen, einschließlich Morbus Niemann-Pick Typ A und B, Morbus Gaucher Typ 3, Morbus Sandhoff oder Morbus Wilson oder auch neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Huntington (Patterson et al. 2012).

Für die Detektion der Krankheit müssen Patienten mit dem Verdacht auf NPC1 in einer umfangreichen Anamnese mögliche frühkindliche viszerale oder neurologische Symptome darstellen. Eines der frühesten neurologischen Symptome sind Veränderungen in der Augenbeweglichkeit, wobei die Art der Anomalie abhängig vom Krankheitsfortschritt ist (Abel et al. 2009; Solomon et al. 2005; Lengyel et al. 1999; Philippart et al. 1983). Neben der Beurteilung der Hepatosplenomegalie, neurologischer, psychiatrischer und kognitiver Symptome, kann die Diagnose auch über verschiedene Laboranalysen erfolgen (reviewed in Patterson et al. 2012). Neben der Detektion verschiedener Marker wie Chitotriosidase, spezifischer Chemokine und Oxysterole besteht weiterhin die Möglichkeit einer histologischen Beurteilung von Haut- oder Leberbiopsien über die Identifizierung der charakteristischen Schaumzellen oder elektronenmikroskopischer Beurteilung (Wakida et al. 2004; Boustany et al. 1990; Elleder et al. 1984). Einer der wichtigsten Tests ist aber die Fibroblastenkultur aus einer Hautbiopsie des Patienten und der anschließenden Darstellung des gestörten Cholesteroltransports durch die Markierung mit Filipin. Parallel zu dieser Methode empfiehlt sich eine zusätzliche DNA-Sequenzierung, um den genauen Ort der Mutation feststellen zu können.

1.2.4. Therapie

Bislang ist Morbus Niemann-Pick Typ C1 eine nicht heilbare, progredient neurodegenerative Erkrankung, welche lediglich symptomatisch behandelt werden kann. Diese umfasst dabei verschiedene Behandlungsansätze wie beispielsweise Antiepileptika gegen Krampfanfälle, anticholinerge Medikamente gegen Dystonie und Tremor, eine antipsychotische und antidepressive Therapie sowie die Behandlung von gastrointestinalen Störungen (Patterson et al. 2012).

Die bislang einzig zugelassene, krankheitsspezifische Therapieoption in Europa, Japan und Kanada ist die Behandlung mit Miglustat im Rahmen einer Substrat-Reduktions-Therapie (Platt und Jeyakumar 2008). In Kombination mit Allopregnanolon konnten synergistische Effekte im Tiermodell und beim Menschen gezeigt werden (Davidson et al. 2009; Hovakimyan et al. 2013a). Erst später konnte der therapeutische Erfolg von Allopregnanolon auf das eigentliche Lösungsmittel 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) zurückgeführt werden (Liu et al. 2009; Griffin et al. 2004).

Miglustat (Zavesca®)

Lange lag der krankheitsspezifische Behandlungsfokus auf der Reduktion der Lipidspeicherung in den späten LE/L. Hierfür eignet sich Miglustat (N-butyl-deoxynojirimycin, $C_{10}H_{21}NO_4$), welches unter dem Handelsnamen Zavesca® vertrieben wird. Dabei handelt es sich um einen kleinen N-alkylierten Iminozucker (Abbildung 7), der als synthetisches Analogon der D-Glucose die Glucosylceramidsynthase hemmt, welche wiederum den ersten Schritt der Glycosphingolipidsynthese katalysiert. Folglich kann die Akkumulation der meisten GSL wie GM2 oder GM3 reduziert werden (Butters et al. 2000; Platt et al. 1994; Lyseng-Williamson 2014; Wraith et al. 2009). Miglustat ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und zeigte in präklinischen Studien im Rahmen einer Substratreduktions-Therapie (SRT) eine Reduktion der GSL-Akkumulationen im Gehirn, eine erhöhte Lebenserwartung und einen verzögerten Beginn der neurologischen Symptome (Zervas et al. 2001b). Auch in klinischen Studien konnte bei allen Patienten eine Verzögerung der neurologischen Symptome beobachtet werden, sowohl bei adulten NPC Patienten als auch bei Kindern, wobei der therapeutische Erfolg bei späterem Krankheitsbeginn größer ist (Patterson et al. 2007; Pineda et al. 2009; Wraith et al. 2010; Chien et al. 2013; Ginocchio et al. 2013). Die meisten Studien zeigten eine Verbesserung verschiedener neurologischer Parameter wie z.B. der horizontalen, sakkadischen Augenbewegungen, der kognitiven und der motorischen Fähigkeiten inklusive einer Verbesserung der Ataxie, Dystonie und Dysarthrie. Nachdem Miglustat bereits seit November 2002 für die Behandlung von Morbus Gaucher Typ 1 zugelassen wurde, darf das Medikament als erstes krankheitsspezifisches Medikament für NPC auch seit 2009 in Europa, seit 2010 in Kanada und seit 2012 Japan angewendet werden.

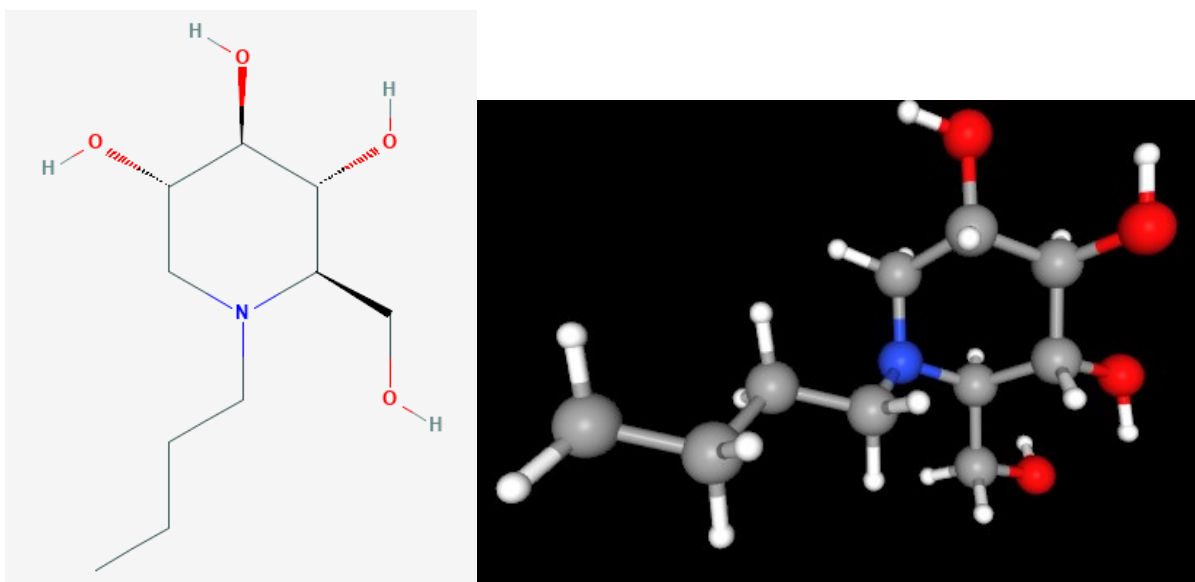


Abbildung 7 Strukturformel von Miglustat (Zavesca®, N-butyl-deoxynojirimycin, $C_{10}H_{21}NO_4$). Miglustat ist ein kleiner N-alkylierter Iminozucker, der reversibel die Glucosylceramidsynthase hemmt. Die linke Seite zeigt die Struktur in 2D und rechts in 3D (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database).

Allopregnanolon (Pregnan-3-alpha-ol-20-one)

Allopregnanolon (Abbildung 8) ist ein endogenes Neurosteroid, welches aus Cholesterol synthetisiert wird, indem dieses durch P450scc in Progesteron umgewandelt und anschließend durch die Reduktion mit der 5 α -Reduktase und 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase zu Allopregnanolon transformiert wird (Griffin et al. 2004). Durch die allosterische Regulation des GABA-A-Rezeptors kann Allopregnanolon die Ionenkanäle beeinflussen, indem es den Einstrom von Chlorid-Ionen erhöht und damit die Erregbarkeit der Zellen erniedrigt (Lambert et al. 2003; Reddy 2010). Dadurch hat Allopregnanolon eine beruhigende, anxiolytische und krampflösende Wirkung (Reddy 2003; Johnston et al. 2010). Darüber hinaus beeinflusst Allopregnanolon das neuronale Wachstum und Überleben und hat eine protektive Wirkung auf Neurone, indem es eine Veränderung der Zellmorphologie bewirkt (Brinton 1994; Brussaard et al. 2000).

Da Allopregnanolon im ZNS von *Npc1*^{-/-} Mäusen nachweislich reduziert ist, sollte dieses in Form einer Substratersatz-Therapie behandelt werden (Griffin et al. 2004). Bei diesem Ansatz sollen fehlende oder verminderte Substanzen ersetzt werden, um eine normale Zellfunktion ermöglichen zu können (Walkley 2007). Griffin et al. konnten eine signifikante Verbesserung in NPC-Mäusen nachweisen, indem sie einen verzögerten Beginn der neurologischen Symptome, eine verminderte Reduktion der Purkinjezellen, geringere Akkumulationen von Gangliosiden, insbesondere GM2 und GM3, und eine erhöhte Lebenserwartung feststellten (Griffin et al. 2004).

Da Allopregnanolon nur geringfügig in Wasser gelöst werden kann, sollte hierfür ein wässriger Puffer oder eine isotonische Salzlösung verwendet werden, um die Löslichkeit zu erhöhen. In der genannten Studie wurde Allopregnanolon in 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) (20%, in Wasser) gelöst. In späteren Studien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der therapeutische Erfolg nicht auf das Allopregnanolon selbst, sondern auf das Lösungsmittel HP β CD zurückzuführen ist (Liu et al. 2010; Ramirez et al. 2010; Matsuo et al. 2013; Vance und Karten 2014).

Dennoch konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass Allopregnanolon einen protektiven Effekt vor oxidativem Stress und Peroxid-induzierter Apoptose auf Fibroblasten-Kulturen von NPC-Patienten hat (Zampieri et al. 2009). Auch beim Morbus Alzheimer konnte gezeigt werden, dass Allopregnanolon neuroprotektiv wirkt (Qian et al. 2015; Irwin und Brinton 2014), einen proliferativen Effekt auf neuronale Vorläuferzellen in vitro hat (Wang et al. 2005), die Neurogenese im Hippocampus fördert (Wang et al. 2010) und die Lebensdauer von neuronalen Vorläuferzellen sowie die kognitiven Fähigkeiten verbessert (Singh et al. 2012).

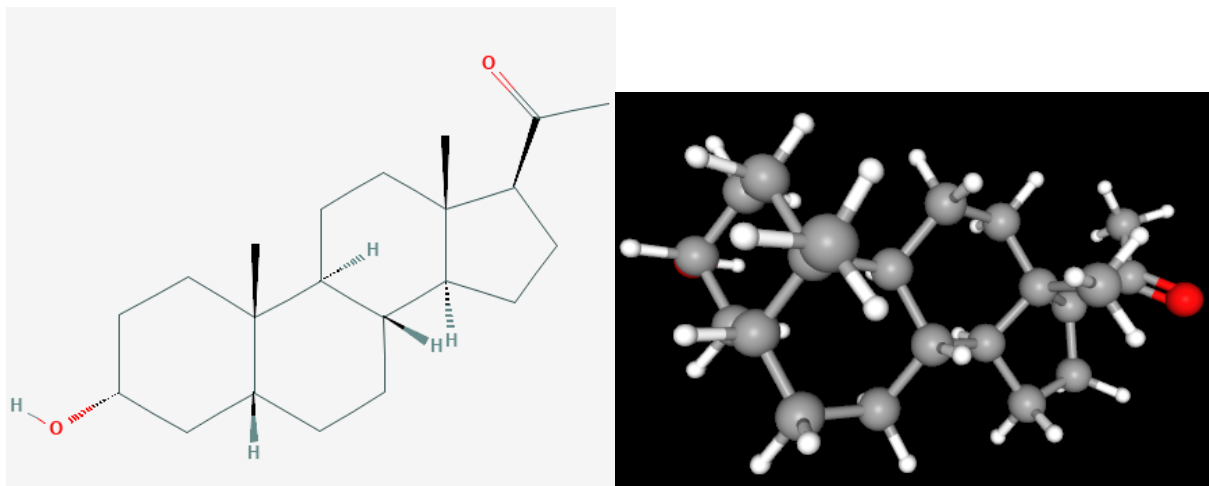


Abbildung 8 Strukturformel von Allopregnanolon (Pregnan-3- α -ol-20-one, $C_{21}H_{34}O_2$). Allopregnanolon ist ein endogenes Neurosteroid, welches aus Progesteron synthetisiert wird und als allosterischer Modulator des GABA-A-Rezeptors fungiert. Die linke Seite zeigt die Struktur in 2D und rechts in 3D. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database.)

Cyclodextrin (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin)

Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, welche aus α -1,4-glykosidisch verbundenen Glukosemolekülen zusammengesetzt werden und beim Abbau von Stärke gebildet werden. In Abhängigkeit von der Anzahl der Glucosemoleküle kann zwischen α - (6 Glucosemoleküle), β - (7 Glucosemoleküle) und γ -Cyclodextrinen (8 Glucosemoleküle) unterschieden werden. Die Anordnung der Glucose-Bausteine führt zu einer lipophilen Kavität im Inneren des Moleküls und einer hydrophilen Außenseite und ermöglicht dadurch Einschlussverbindungen mit apolaren organischen Verbindungen wie Allopregnanolon. Aufgrund dieser Eigenschaft sind Cyclodextrine häufig unter anderem in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie zu finden, aber auch im pharmazeutischen Bereich.

2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) gehört zu den aus 7 Glucose-Einheiten aufgebauten β -Cyclodextrinen (Abbildung 9) und zeigte einen signifikanten therapeutischen Nutzen in NPC-Mausmodellen. Nachdem HP β CD ursprünglich nur als Trägersubstanz für Allopregnanolon eingesetzt wurde, konnte die Wirksamkeit im NPC-Mausmodell im Nachhinein auf das HP β CD zurückgeführt werden (siehe Kapitel Allopregnanolon). Obwohl der genaue Wirkmechanismus von HP β CD bislang nicht genau geklärt ist, konnte in präklinischen Tiermodellen und klinischen Studien nachgewiesen werden, dass eine regelmäßige Behandlung mit HP β CD den Beginn der neurologischen Symptome verzögert, die Lebenserwartung steigert und die Cholesterolkonzentration in den Organen reduziert (Davidson et al. 2009; Liu et al. 2010; Ramirez et al. 2010; Matsuo et al. 2013; Vance und Karten 2014; Tanaka et al. 2015). Bereits eine einzige Dosis von HP β CD bei 7 Tage alten

Npc1^{-/-}-Mäusen führte zu einer deutlich erhöhten Lebenserwartung und einer mehr als zweifach erhöhten Anzahl zerebellärer Purkinje-Zellen (Liu et al. 2009).

Mehrere Studien zeigten therapeutische Erfolge von HPßCD in NPC-Patienten. So konnten Tanaka et al. (2015) einen deutlichen Benefit nach einer intravenösen Behandlung mit 2500 mg/kg HPßCD zweimal pro Woche nachweisen. Maarup et al. (2015) wiesen eine Stabilisierung des Krankheitszustandes in einem Patienten nach anderthalbjähriger intrathekalen Injektion von 200 mg HPßCD nach. Auch Matsuo et al. (2013) konnten einen Therapieerfolg in zwei Patienten während der ersten 6 Behandlungsmonate mit einer allmählichen steigenden Konzentration von 80 mg/kg bis 2,5 mg/kg feststellen. Zwar konnten sie keine Veränderungen der neurologischen Defizite erkennen, allerdings eine reduzierte Hepatosplenomegalie und ZNS-Dysfunktion.

Da HPßCD die Blut-Hirn-Schranke nicht oder nur in geringem Maße passieren kann (Camargo et al. 2001; Monnaert et al. 2004), ist bereits die Art der Verabreichung von Bedeutung. So kann die Anwendung von HPßCD sowohl intravenös, subkutan, intracerebroventrikulär als auch intrathekal erfolgen. Megias-Vericat et al. (2017) fassen in einem Review den Therapieerfolg und die Nebenwirkungen von HPßCD von 17 Patienten zusammen, von denen die meisten einen therapeutischen Benefit oder eine Stabilisierung des Krankheitszustands aufweisen konnten. Weiterhin wurden auch 17 verschiedene Nebenwirkungen zusammengestellt, von denen 11 auf das Medikament direkt zurückzuführen sind und 6 auf die Art der Verabreichung. Trotz des nachgewiesenen geringen toxischen Potentials kann die Behandlung mit HPßCD u.a. zu Fieber, chemischer Meningitis (García-Robles et al. 2016) und einer Beeinträchtigung der Hörfähigkeit führen (Crumling et al. 2012; Ward et al. 2010; Vite et al. 2015).

Trotz der vielversprechenden Therapieerfolge ist Miglustat das bislang einzige krankheitsspezifische Medikament, das in Europa, Kanada und Japan zugelassen ist. In den USA lief von 2012 bis 2017 eine nicht-randomisierte, Open-Label Studie der Phase I/IIa des National Institutes of Health (NCT01747135). Das Ziel dieser Studie war es, die Sicherheit und Effektivität von HPßCD in 14 NPC1-Patienten im Alter von 4 bis 23 Jahren zu untersuchen. Dieses sollte den Patienten intrathekal in Konzentrationen von 200 mg ansteigend bis zu 900 mg injiziert werden. Nach 18 Monaten konnte zwar in allen Patienten ein Hörverlust bei mittleren bis hohen Frequenzen diagnostiziert werden, jedoch ohne signifikante Auswirkungen auf die Kommunikation und mit einem verzögerten Krankheitsfortschritt und einem akzeptablen Sicherheitsprofil (Ory et al. 2017). Die nachfolgenden Ergebnisse zeigten, dass sich auch nach 36 Monaten die kognitiven und adaptiven Fähigkeiten der Patienten nicht signifikant verschlechtern und der Krankheitsverlauf deutlich verzögert (Farmer et al. 2019).

Aktuell läuft seit Oktober 2015 eine prospektive, randomisierte Doppelblind-Studie der Phase IIb/III mit 51 Patienten, von denen ca. 1/3 scheinbehandelt und voraussichtlich im September 2020 beendet wird.

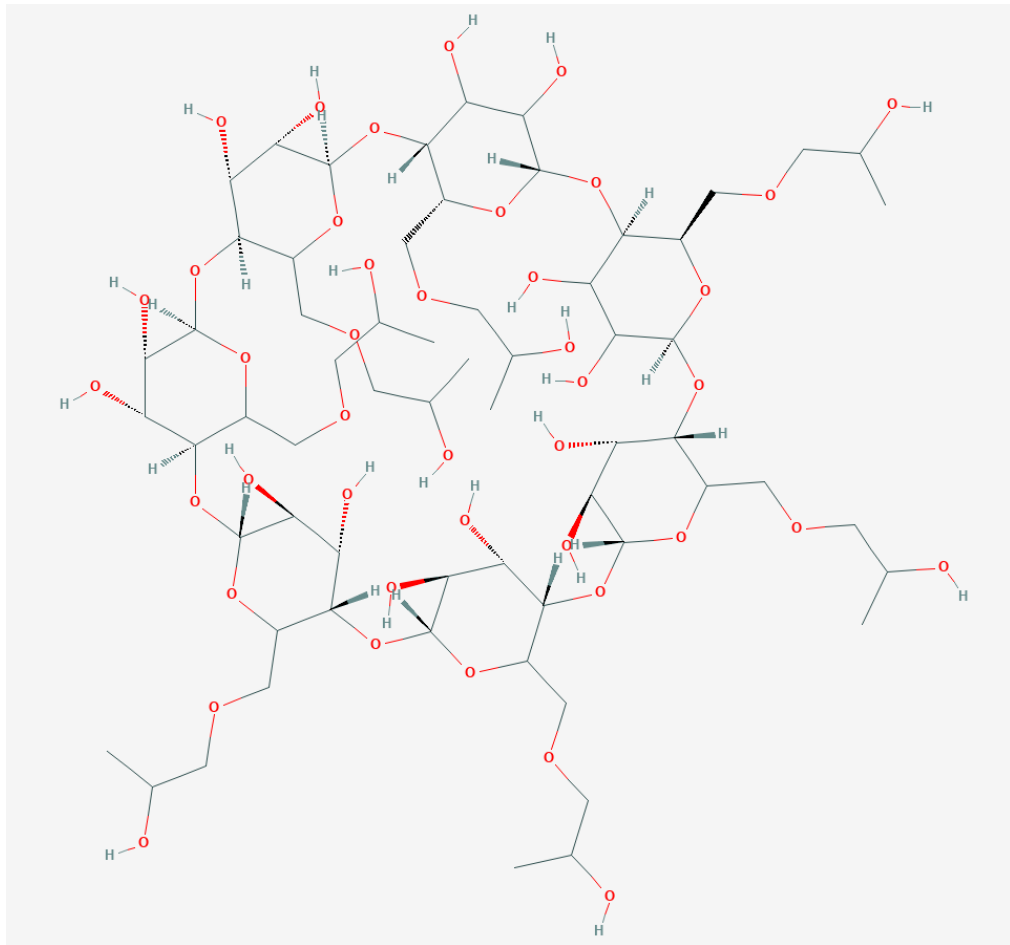


Abbildung 9 Strukturformel von Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (HPβCD, C₅₄H₁₀₂O₃₉). HPβCD ist ein zyklisches Oligosaccharid, welches aus 7 Glucose-Bausteinen besteht. Die Kavität im Zentrum ermöglicht den Einschluss und Transport apolarer, organischer Substanzen. Die Darstellung erfolgt aufgrund der Komplexität des Moleküls nur in 2D. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database)

Andere Therapieoptionen

Neben einer umfassenden symptomatischen Behandlung und den genannten krankheitsspezifischen Medikamenten Miglustat und HPβCD, gibt es zwei weitere potentielle Therapieoptionen. Eine Möglichkeit ist die Hemmung der Histon-Deacetylase (HDAC), welche eine wichtige Rolle beim neuronalen Überleben spielt (Bardai et al. 2012; Nunes et al. 2013). Durch die Hemmung der HDAC wird die Transkription von Genen moduliert, welche Teil des Cholesterol-Stoffwechsels sind, welches wiederum zu einer Reduktion des Cholesterolhaushalts führt (Nunes et al. 2013). Der bereits klinisch erprobte HDAC-Inhibitor SAHA (Suberoylanilid Hydroxamsäure) zeigte in NPC1-defizienten Zellen eine Reduktion der Cholesterolakkumulationen in den LE/L, wobei dieser Effekt nicht bei NPC2-defizienten Zellen nachweisbar war (Munkacsı et al. 2011; Pipalia et al. 2011).

Eine andere Therapieoption ist die Behandlung mit dem anti-apoptotisch wirksamen Imatinib. Dieser anti-kanzerogene Wirkstoff hemmt die Kinase c-Abl, welche die Apoptose cerebellärer Neurone steuert und mit den neurodegenerativen Prozessen bei NPC assoziiert ist. Durch die Behandlung mit Imatinib kann der Verlust der Purkinje-Zellen verhindert werden (Alvarez et al. 2008).

1.2.5. NPC1-Mausmodell

In dieser Arbeit wurde ein weit verbreitetes BALB/cNctr-Npc1m1N/J-Mausmodell verwendet. Durch eine Retrotransposon-Insertion und einer 703-bp Deletion im NPC1-Gen kommt es zum Funktionsverlust des NPC1-Proteins (Loftus et al. 1997). Dieser Defekt führt zu einem gestörten Transport verschiedener Lipide von den LE und Lysosomen zum ER und folglich zu einer Akkumulation von unverestertem Cholesterol, Glycolipiden, GSL und Fettsäuren (Chen et al. 2005; Liao et al. 2007; te Vruchte et al. 2004; Neufeld et al. 1999; Sokol et al. 1988) und entspricht eher dem frühen infantilen Krankheitsverlauf (Maue et al. 2012).

Die homozygoten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen eine Hepatosplenomegalie und eine progressive Neurodegeneration (Erickson et al. 2005). Ab einem Lebensalter von 42 bis 49 Tagen zeigen die *Npc1*^{-/-} Mäuse deutliche visuelle Symptome wie Zittern, Verlust der motorischen Koordination und anhaltenden Gewichtsverlust, wobei die Symptome tatsächlich bereits ab Tag 25 beginnen (Võikar et al. 2002). Die Neuropathologie ist gekennzeichnet durch einen fortschreitenden Verlust der zerebellären Purkinje-Zellen (Maass et al. 2015; Elleder et al. 1985; Tanaka et al. 1988; Higashi et al. 1993) und Neuronen aus anderen Regionen des ZNS wie beispielsweise in den Basalganglien, Thalamus (German et al. 2001; Love et al. 1995), dem piriformen Cortex und dem Hippocampus (Yamada et al. 2001). Darüber hinaus zeigt NPC1-defiziente Hirn neuroinflammatorische Reaktionen und eine Reduktion der Galactosylceramide, einem Myelinlipid, und deutliche Demyelinisierung (Vanier 2015; German et al. 2001; Weintraub et al. 1987; Weintraub et al. 1985). Da Myelin eine hohe Cholesterol-Konzentration aufweist, besteht die Möglichkeit, dass die Demyelinisierung einen potentiell erhöhten Cholesterolgehalt in anderen Zellen nur maskiert (Peake und Vance 2010; Xie et al. 2000; Sarna et al. 2003; Yan et al. 2011; Yu und Lieberman 2013; Goodrum und Pentchev 1997).

Die Kombination der Substratersatz- und Substratreduktionstherapie mit HPβCD, Allopregnanolon und Miglustat zeigte in der Vergangenheit deutliche therapeutische Erfolge im NPC1-Mausmodell. So konnte der Beginn der klinischen Symptome verzögert und die Lebenserwartung der *Npc1*^{-/-} Mäuse deutlich verlängert werden. Darüber hinaus reduzierte die Kombinationstherapie sowohl die intrazellulären Lipidakkumulationen als auch den zerebellären Purkinje-Zellverlust und verbessert die motorischen Fähigkeiten

(Maass et al. 2015; Hovakimyan et al. 2013a; Taylor et al. 2012; Aqul et al. 2011; Hovakimyan et al. 2011; Davidson et al. 2009).

Die richtige und frühzeitige Erkennung von NPC1 ist zusammen mit einer entsprechenden und spezifischen Therapie kann die Lebenserwartung und –qualität der Patienten signifikant verbessern. Die Einbeziehung der olfaktorischen Beeinträchtigungen kann hierfür ein geeignetes diagnostisches Mittel darstellen.

2. Ziel und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die morphologischen und immunhistochemischen Auswirkungen des Morbus Niemann Pick Typ C1 auf das olfaktorische System in einem NPC1-Mausmodell zu untersuchen. Da Riechstörungen sehr häufig bei neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, sollte mit dieser Arbeit insbesondere die Regenerationsfähigkeit des olfaktorischen Epithels (OE) und des Bulbus olfactorius (OB) analysiert werden. Hierfür wurden zum einen unbehandelte kranke *Npc1*^{-/-} mit unbehandelten gesunden Kontrollmäusen (*Npc1*^{+/+}) verglichen.

- I. Gibt es im OE und OB Unterschiede im Proliferations- und Apoptoseverhalten zwischen unbehandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen?
- II. Hat Morbus NPC1 Auswirkungen auf das neuronale Profil im OE und OB?

Weiterhin soll der therapeutische Benefit zweier Behandlungsstrategien (Kombi- und HPßCD-Behandlung) auf die Zellhomöostase und das neuronale Profil von OE und OB der *Npc1*^{-/-} Mäuse untersucht werden.

- Haben die Behandlungen einen Einfluss auf die Pathologie im OE und OB der *Npc1*^{-/-} Mäuse?
- Gibt es Unterschiede zwischen den beiden Therapieformen?

In Ergänzung zu den morphologischen Studien sollte weiterhin geklärt werden, ob die morphologischen Beeinträchtigungen der *Npc1*^{-/-} Mäuse auch funktionell in einem olfaktorischen Verhaltenstest nachweisbar sind.

- Können die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse tatsächlich auch schlechter riechen?
- Wird die Riechfähigkeit der *Npc1*^{-/-} Mäuse durch die Kombi- und/oder HPßCD-Behandlungen verändert?

Zusätzlich sollen potenzielle, therapieassoziierte Einflüsse sowohl auf die Morphologie als auch auf die Funktionalität des olfaktorischen Systems der gesunden *Npc1*^{+/+} Mäuse untersucht werden.

- Beeinflussen die Therapien die neuronale Struktur oder die Zellhomöostase im OE oder OB der *Npc1*^{+/+} Mäuse?
- Haben die Therapien einen Einfluss auf die Riechfähigkeit der behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse?

Abschließend soll geklärt werden, ob sich die Regenerationsfähigkeit von dem peripheren (OE) und zentralen Nervensystem (OB) unterscheidet.

3. Material und Methoden

3.1. Tiere

Für die nachfolgenden Studien wurden heterozygote BALB/cNctr-NPC1m1N/-J Mäuse (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) verpaart und das olfaktorische System der kranken, homozygoten *Npc1*^{-/-} und der gesunden, homozygoten *Npc1*^{+/+} Kontrollen analysiert. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser ad libitum bei einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus, einer Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Die Genotypisierung erfolgte bis Tag P7 durch eine PCR-Analyse der Schwanzbiopsien. 63 *Npc1*^{-/-} Mutanten und 65 *Npc1*^{+/+} Kontrollen wurden unabhängig vom Geschlecht für die verschiedenen Behandlungsformen verwendet.

Alle Versuche wurden entsprechend der Regeln und Richtlinien der Ethikkommission der Universität Rostock durchgeführt (genehmigt vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern TST/7221.3-1.1-030/12 und TST/7221.3-1.1-011/16).

3.1.1. Genotypisierung

Für die Bestimmung des genetischen Hintergrundes der Mäuse wurden an Tag P6 Schwanzbiopsien von 1-2 mm genommen und mit DirectPCR-Tail und 1% Proteinase K (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bei 55°C mit 750 U/min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 16h über Nacht homogenisiert, um die Template DNA zu isolieren. Die Extrakte wurden anschließend für 30 s bei 6000 U/min zentrifugiert und die PCR-Analyse zweifach mit je 2µl des Lysats und zwei verschiedenen Primer-Paaren unter identischen Bedingungen durchgeführt. Für die Identifizierung der *Npc1*^{+/+} Wildtyp-Bande (173bp) wurden die Primer 5'-tctcacagccacaagcttcc-3' und 5'-ctgtagctcatctgccatcg-3' verwendet, für die *Npc1*^{-/-} Mutanten das Primer-Paar 5'-gggtgctggacagccaagta-3' und 5'-tgagcccaagcataactt-3' (475bp) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland).

3.1.2. Pharmakologische Behandlung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss zweier Therapiemodelle auf die Plastizität des olfaktorischen Systems der *Npc1*^{-/-} und *Npc1*^{+/+} Mäuse untersucht. Im Rahmen der Kombinations-Behandlung (Kombi) wurde eine synergistisch wirkende Kombination aus HPßCD, Allopregnanolon und Miglustat verabreicht, welche an Tag P7 mit einer wöchentlichen, intraperitonealen Injektion von Allopregnanolon (Pregnan-3alpha-ol-20-

one; 25mg/kg; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) gelöst in HPβCD (2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin; 4.000mg/kg; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; in Ringer-Lösung) startete (Davidson et al. 2009). Zusätzlich erfolgte die tägliche, intraperitoneale Verabreichung von 300mg/kg, in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem Miglustat (N-butyl-deoxynojirimycin, ein Geschenk von Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, Schweiz) von Tag P10 bis P22. Nach der Entwöhnung der Jungtiere ab Tag P23 wurde Miglustat (1.200mg/kg) täglich über das Futter verabreicht.

Zusätzlich sollte der Einfluss einer HPβCD-Monotherapie (HPβCD) untersucht werden. Bei diesem Therapiemodell wurde den Mäusen im gleichen Rhythmus ausschließlich HPβCD (4.000mg/kg; in Ringer-Lösung) ab Tag P7 bis zur Perfusion wöchentlich intraperitoneal injiziert.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden sowohl behandelte, als auch unbehandelte *Npc1*^{+/+} sowie unbehandelte *Npc1*^{-/-} Mäuse als Kontrollen verwendet. Für den Buried Pellet Riechtest (siehe Abschnitt 3.4) wurden erneut *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäuse gezüchtet, welche nach dem identischen Therapieplan der Kombi- und HPβCD-Behandlung behandelt wurden. Um injektionsbedingte Einflüsse auf das Verhalten der Mäuse auszuschließen, wurde den *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Kontrolltieren, die keine Medikamente erhielten, im gleichen Rhythmus Ringerlösung injiziert. Diese Tiere werden nachfolgend als „sham-behandelt“ bezeichnet.

Insgesamt ergeben sich dadurch sowohl für die immunhistochemischen Untersuchungen als auch für den olfaktorischen Verhaltenstest jeweils 6 Behandlungsgruppen, welche anschließend miteinander verglichen werden. Der Therapieplan ist in Abbildung 10 zusammengefasst.

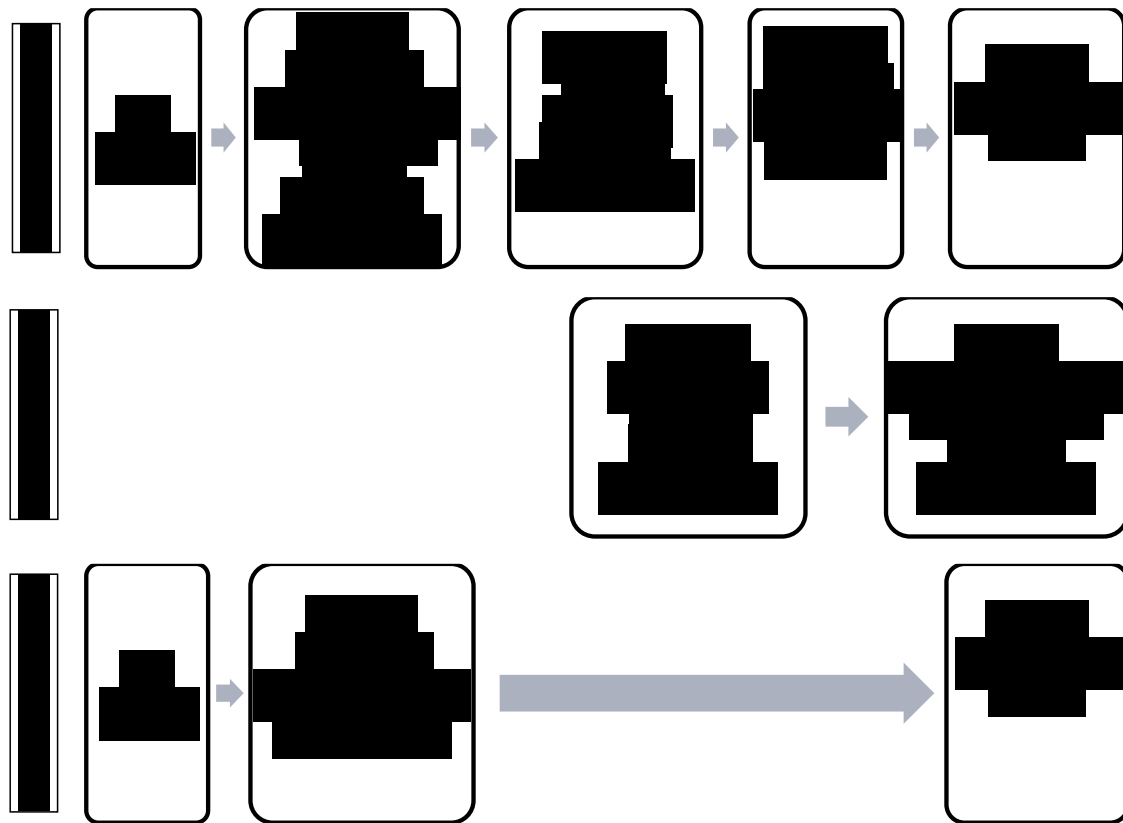


Abbildung 10 Übersicht der Kombinations- und der HPβCD-Behandlung. Sowohl die *Npc1*^{+/+} als auch die *Npc1*^{-/-} Mäuse wurden je nach Behandlungsgruppe ab Tag P7 regelmäßig mit Miglustat, Allopregnanolon und HPβCD behandelt. Für die Analyse der Proliferationsaktivität wurde den Mäusen zusätzlich BrdU injiziert.

3.1.3. 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU)-Injektionen

5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon, welches während der S-Phase der DNA-Synthese in die DNA eingebaut wird. Folglich ist BrdU ein zuverlässiger Marker für die Quantifizierung proliferativer Zellen im Gewebe (Dover und Patel 1994; Onda et al. 1994).

Für die Markierung proliferierender Zellen im OB wurde allen Tieren aus der morphologischen Studie ab Tag P40 bis P46 zweimal täglich BrdU (50mg/kg, Sigma, St. Louis, MO; gelöst in physiologischer Kochsalzlösung) intraperitoneal injiziert. Zusätzlich wurde eine finale Dosis zwei Stunden vor der Perfusion an P55-56 verabreicht, um die sich schnell teilenden Zellen des OE zu markieren (Abbildung 10). Die so markierten Zellen konnten später immunhistochemisch nachgewiesen werden.

3.2. Histologische Aufarbeitung

1.2.1. Probenpräparation

Die Perfusion der jeweils 18 *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäuse für die morphologische Studie erfolgte zwischen dem 55. und 56. Lebenstag. Hierfür wurden die Mäuse mit einem Mix aus 50 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Bela-Pharm GmbH & Co KG, Vechta, Deutschland) und 2 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert und, nach vorheriger Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung, mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA; in 0,1M PBS, pH 7,4) intrakardial perfundiert. Die Mäuse wurden anschließend dekapitiert und der Unterkiefer, Zunge und Schneidezähne sowie die Haut und Muskulatur gründlich entfernt. Der restliche Schädel wurde inklusive der Nasenschleimhaut und des gesamten Hirns über Nacht in 4%igen PFA nachfixiert und anschließend in 10%iger EDTA-Lösung bei 37°C im Brutschrank für ca. 1 Woche dekalzifiziert. Danach erfolgte die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Propanolreihe (2x 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 2x 100 %, 2x Xylol) und die Paraffineinbettung.

Die eingebetteten Präparate wurden in 10er-Serien mit einer Schnittdicke von 10 µm mit einem Rotationsmikrotom (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) frontal geschnitten. Dabei wurde das komplette OE sowie der OB aufgearbeitet und alle Schnitte auf beschichteten Objektträgern (Superfrost Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) gesammelt. Für eine Analyse der Zellmorphologie und eine bessere Orientierung wurde von dem ersten Objektträger jeder Serie eine H.E.-Übersichtsfärbung mit Hämalun nach Mayer (CAS-Nr. 517-28-2, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Eosin G (CAS-Nr. 17372-87-7, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) angefertigt.

1.2.2. Immunhistochemie

Für die Beurteilung des immunhistochemischen Profils der sechs Behandlungsgruppen wurde die Reaktivität der Paraffinschnitte vom OE und OB gegen verschiedene Antikörper ausgewertet (Tabelle 1). Im Vordergrund stand dabei die Analyse der Auswirkungen von Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) auf die Homöostase von Proliferation und Apoptose im OE und OB, welche durch die Immunreaktivität von anti-5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU, Abd Serotec, Puchheim, Deutschland) und anti-Cleaved Caspase 3 (Cas-3, clone Asp175, Cat No. 9661, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) analysiert wurde.

Zusätzlich wurden im OE die immunhistochemischen Reaktionen der reifen ORN mit dem anti-Olfactory Marker Protein (OMP, Cat No. O7889, Sigma, St. Louis, MO, USA), der unreifen ORN durch das anti-Growth Associated Protein 43 (GAP43, #EP890Y, Abcam, Cambridge, England) und die Makrophagenaktivität mittels anti-Cathepsin D (CathD, Cat No. PU205-UP, BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA) beurteilt.

Im OB wurden sowohl die dopaminergen Neurone mittels Tyrosinhydroxylase (TH, #AB1542, Millipore, Temecula, CA, United States) als auch mögliche Inflammationsprozesse durch die immunhistochemische Markierung der Makroglia mit dem anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP, #Z0334, Dako, Hamburg, Deutschland) und der Mikroglia mit anti-Iba1 (#019-19741, Wako, Osaka, Japan) näher betrachtet.

Die Immunreaktivität der verschiedenen Antikörper wurde im Anschluss für alle sechs Behandlungsgruppen qualitativ ausgewertet und miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde auch die Anzahl der BrdU(+) Zellen im OE und OB sowie die Anzahl der OMP(+) und Cas-3(+) Zellen im OE bzw. der TH(+) Zellen im OB quantifiziert (siehe Kapitel 1.3).

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Zielstruktur
rat anti-BrdU	1:2000	Abd Serotec	proliferierende Zellen
rabbit anti-OMP	1:6000	Sigma	reife ORN
rabbit anti-Cas-3	1:500	Cell Signaling Technology	apoptotische Zellen
rabbit anti-CathD	1:6000	BioGenex	Makrophagen, lysosomale Aktivität
rabbit anti-GAP43	1:1000	Abcam	unreife ORN
sheep anti-TH	1:1000	Millipore	dopaminerge Interneurone
rabbit anti-GFAP	1:2000	Dako	Astrozyten
rabbit anti-Iba1	1:4000	Wako	Mikroglia

Tabelle 1 Zusammenfassung der verwendeten Primärantikörper mit der jeweiligen Wirtsspezies, der angewendeten Verdünnung, dem Hersteller und der dargestellten Zielstruktur.

Für die Quantifizierung proliferierender Zellen im OE und OB wurde jeder 10. Schnitt im Intervall von 100 µm immunhistochemisch mit anti-BrdU markiert. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit Xylol (3x 5min) entparaffiniert, über eine absteigende Propanolreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, Aqua dest.) rehydriert und anschließend 5 Minuten bei 680W in der Mikrowelle in 0,1 M Zitratpuffer gekocht, um die freien Epitope aufzubrechen. Danach erfolgte für 30 Minuten die Hemmung endogener Peroxidasen mit 3%igem Wasserstoffperoxid in 0,1 M PBS und das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Normal Goat Serum in PBS (NGS; S-1000, Vector, Burlingame, CA, USA) in PBS für 1h. Der Primärantikörper anti-BrdU wurde in einer Verdünnung von 1:2000 (in 3 % NGS in 0,1M PBS) Tabelle 1 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer gründlichen Spülung mit 0,1M PBS wurden die Schnitte mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper anti-rat (Biotinylated Goat Anti-Rat-IgG (H+L), BA-9400, Vector, Burlingame, CA, USA) mit einer Verdünnung von 1:200 in 3% NGS in 0,1M PBS für 1h inkubiert, wiederum gespült und das Signal mit einem Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain-Elite; Vector, Burlingame, CA, USA) für eine weitere Stunde amplifiziert. Anschließend erfolgte die Sichtbarmachung mit H₂O₂ (0,0035%) aktivierten Peroxidasesubstrat Diaminobenzidin (DAB, 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, 0,1% in 0,1M PBS) für 2min. Abschließend wurden die Schnitte wieder über eine aufsteigende Propanolreihe und Xylol dehydriert und mit DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckelt.

Im OE wurden zusätzlich für die Quantifizierung der reifen ORN benachbarte Serienschnitte ähnlich zum vorangegangenen Schema mit anti-OMP sowie eine weitere

Serie mit rabbit anti-Cas-3 (1:500), rabbit anti-GAP43 (1:1000) und rabbit anti-CathD (1:6000) inkubiert. Im OB erfolgten weiterhin immunhistochemische Markierungen mit sheep anti-TH (1:1000), rabbit anti-GFAP (1:2000), rabbit anti-Iba1 (1:4000) und rabbit anti-Cas-3 (1:500). Nach der Entparaffinierung erfolgte bei diesen Antikörpern die Denaturierung in der Mikrowelle für 5 Minuten bei 850W und 5 Minuten bei 340W in 0,1M Zitratpuffer. Nach der Peroxidasehemmung und dem anschließenden Blockvorgang mit 3 % BSA (Albumin Fraktion V, CAS-Nr.: 90604-29-8, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 1,5 % Normalserum in 0,1M PBS für 1 Stunde (Normal Goat Serum bei rabbit anti-OMP, Cas-3, GAP43, CathD, Iba1 und GFAP; Normal Rabbit Serum bei sheep anti-TH) wurden die jeweiligen Primärantikörper (in 1 % BSA in 0,1M PBS) Tabelle 1 aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem gründlichen Spülvorgang wurden die Sekundärantikörper (Biotinylated Goat anti-Rabbit IgG, BA-1000; Biotinylated Rabbit anti-Sheep IgG, BA-6000; Vector, Burlingame, CA, USA) entsprechend des Primärantikörpers mit einer Verdünnung von 1:200 in 1 % BSA in 0,1M PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Amplifizierung mit Avidin und Biotin, sowie die Visualisierung mit DAB erfolgte wie oben beschrieben.

Für die Kontrollen wurde kein Primärantikörper aufgetragen. In diesen Negativkontrollen konnte keine Immunreaktivität nachgewiesen werden.

1.3. Stereologische Analyse

Für die Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen wurde ein computergestütztes Stereomikroskop (Olympus BX-51, Hamburg, Deutschland) und die Stereologiesoftware Stereo Investigator (Version 8.0, MBF Bioscience, Williston, ND, USA) verwendet. Dabei wurden mit Hilfe der Optical Fractionator Methode die Zelldichten der zuvor immunhistochemisch markierten Zellpopulationen bestimmt, um die einzelnen Genotypen und Behandlungsgruppen miteinander zu vergleichen. Hierfür wurde zunächst die zu analysierende Fläche (region of interest, ROI) bei 2- oder 4-facher Vergrößerung umrandet. Die Software legte dann ein Gitternetz (sampling grid) über die komplette ROI, dessen einzelne Zählfenster (counting frame) mit definierter Kantenlänge dann bei 40facher Vergrößerung systematisch randomisiert durchlaufen wird unter manueller Zählung der positiv markierten Zellen. Die jeweiligen Parameter für die Quantifizierungen der verschiedenen Antikörper sind in

Tabelle 2 zusammengefasst. Die Ergebnisse der Quantifizierungen wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test durch SPSS 22/24 (IBM, Chicago, IL, USA). p -Werte $< 0,05$ werden als signifikant gewertet.

Region	Antikörper	Größe des Sampling Grit in μm	Größe des Counting frame in μm	Intervall in μm	Anzahl der Schnitte je Maus
OE komplett	BrdU	323,7 x 191,3	100 x 100	118 – 128	32 - 40
OE unilateral	OMP	100 x 100	25 x 25	1000	4 - 5
OE unilateral	Cas-3	100 x 100	25 x 25	1000	4 - 5
OB unilateral	BrdU	200 x 200	50 x 50	200	2 - 7
OB unilateral	TH	200 x 200	50 x 50	200	3 - 4

Tabelle 2 Übersicht der Quantifizierungsparameter der verschiedenen Gewebe und Antikörperreaktionen. Detailliertere Informationen siehe Text.

3.3.1. Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen im OE

Für die Quantifizierung der BrdU(+) Zellen im OE wurden von jeder Maus 32-40 komplette Schnitte innerhalb einer durchschnittlichen Fläche von 5000 μm Länge vom Beginn des OE bis zum Anfang des OB und einem Intervall von 118-128 μm ausgezählt. Die Fläche des Gitternetzes betrug hierbei 323,7 x 191,3 μm bei einem Zählrahmen von 100 x 100 μm . Für jede Behandlungsgruppe und jeden Genotyp wurden jeweils 4 Tiere ausgewertet.

3.3.2. Quantifizierung der OMP-positiven und Cas-3-positiven Zellen im OE

Die Quantifizierung der OMP(+) reifen ORN sowie der apoptotischen Cas-3(+) Zellen erfolgte nach der Methode von Kawagishi et al. (2014a). Dabei wurde das unilaterale OE von 4-5 Schnitten mit einem Intervall von 1000 μm analysiert. Die Größe des Gitternetzes wurde hierbei mit einer Fläche von 100 x 100 μm und des Zählrahmens mit 25 x 25 μm festgelegt. Für jede Behandlungsgruppe und jeden Genotyp wurden 4 - 6 Mäuse mit jeweils 4 – 5 Schnitten ausgewertet.

3.3.3. Quantifizierung der BrdU-positiven und TH-positiven Zellen im OB

Im OB wurde das Zählregime aufgrund der geringeren Schnittanzahl in Anlehnung an die Methoden von Sui et al. (2012) und Regensburger et al. (2009) angepasst. In dieser Studie erfolgte die Quantifizierung der BrdU(+) Zellen an 2-7 Schnitten pro Tier in einem Intervall von 200 μm . Die Kantenlänge des Gitternetzes betrug dabei 200 x 200 μm . Der

Zählrahmen hatte eine Größe von 50 x 50µm. Für jede Behandlungsgruppe und jeden Genotyp wurden 5 - 9 Mäuse ausgewertet.

Die Quantifizierung der TH(+) Zellen im OB erfolgte nach dem gleichen Zählregime wie die der BrdU(+) Zellen im OB. Hier wurden für alle sechs Behandlungsgruppen jeweils 3 Tiere mit jeweils 3 – 4 Schnitten.

3.4. Buried Pellet Test

Um herauszufinden, ob die morphologischen Beeinträchtigungen auch tatsächlich Auswirkungen auf die olfaktorische Leistungsfähigkeit der Mäuse haben, wurde ein Riechtest in Form eines Buried Pellet Test auf Grundlage der Protokolle von Lehmkuhl et al. (2014) und Seo et al. (2014) durchgeführt. Die hier getesteten 47 *Npc1*^{+/+} und 45 *Npc1*^{-/-} Mäuse wurden entsprechend ihrer Behandlungsgruppe nahezu identisch wie die Mäuse aus den morphologischen Untersuchungen behandelt. Eine Ausnahme stellen die unbehandelten Kontrollen dar, welche ab Tag P7 mit Ringerlösung behandelt wurden (sham-behandelt), um behandlungs- und stressbedingte Verhaltensänderungen auszuschließen (siehe 3.1.2 Pharmakologische Behandlung).

Für den Buried Pellet Test wurden alle sechs Behandlungsgruppen an Tag P54 - 56 auf die Fähigkeit getestet, im hungrigen Zustand ein im Streu vergrabenes Futterstück zu finden.

Der Test wurde für alle Mäuse unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Mäuse wurden hierfür zunächst vereinzelt und an das zu suchende Futterstück in Form einer zuckerhaltigen Zerealie (Honey Bssss Loops, Kellogg, München, Deutschland), nachfolgend als Pellet bezeichnet, gewöhnt. Dieses Pellet bekamen sie jeweils zwei Tage vor dem Riechtest zusätzlich zum Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Da alle getesteten Mäuse das Pellet fraßen, können Einflüsse von Nahrungspräferenzen auf die Testergebnisse ausgeschlossen werden. Um die Motivation, am Testtag das vergrabene Pellet zu finden, zu maximieren, wurde den Mäusen zusätzlich 18 bis 24h vor Durchführung des Tests das Standardfutter vollständig entzogen.

Am Testtag wurden die Mäuse in dem Testraum zunächst für eine Stunde in einem frisch eingestreuten Standardkäfig (Maße: 207mm x 140mm x 265mm) ohne Futter oder Wasser an die Testumgebung gewöhnt. Für den Buried Pellet Test wurde ein weiterer frischer Standardkäfig mit ca. 3cm Streu befüllt und das Pellet ca. 0,5 cm unter der Streuoberfläche in einer Ecke des Käfigs vergraben, sodass dieses nicht sichtbar ist. Anschließend wurde die zu testende Maus aus ihrem Gewohnungskäfig in den Testkäfig gesetzt, der Käfig geschlossen und die Zeit gestoppt, bis die Maus das Pellet gefunden hat. Endpunkt des Tests war dabei der Moment, in dem die Maus das Pellet ausgegraben hat und in den Vorderpfoten hält. Die maximale Versuchsdauer betrug dabei 5 min. Fand eine Maus das Pellet nicht innerhalb dieser Zeitspanne, galt der Test als nicht bestanden und für die

anschließende statistische Auswertung wurde eine Latenz von 5 min notiert. Für jede Maus wurde ein frischer Käfig verwendet und vor und nach jeder Testung die Handschuhe gewechselt.

Um mögliche Defizite der Motorik oder Motivation zur Futtersuche auszuschließen, wurde im Anschluss ein Surface Pellet Test analog zum Buried Pellet Test durchgeführt mit der Änderung durchgeführt, dass das Pellet nun sichtbar auf der Streuoberfläche platziert wird. Wie bei dem Test zuvor wurde die Maus wieder in den Testkäfig überführt, der Deckel geschlossen und die Zeit gestoppt bis die Maus das Pellet gefunden hat.

Sowohl der Buried als auch der Surface Pellet Test wurden dabei mit einer Videokamera protokolliert. Die Vorbereitungen und der Ablauf des Buried Pellet Tests sind in Abbildung 11 schematisch zusammengefasst.

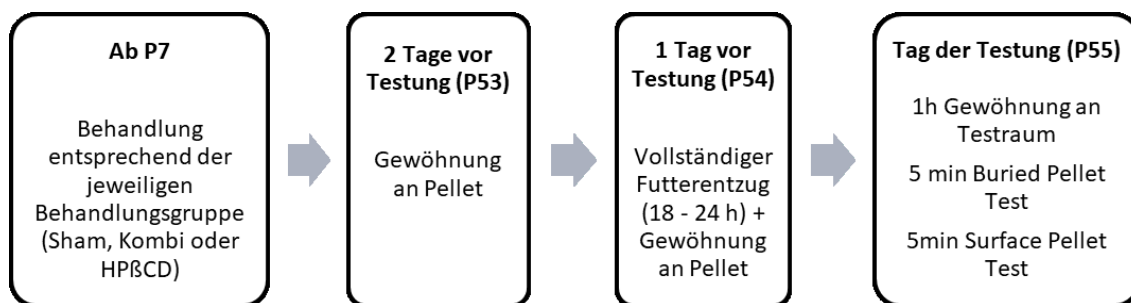


Abbildung 11 Übersicht der Vorbereitung und Durchführung des Buried Pellet Test.

3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus der morphologischen Studie als auch die des Buried Pellet Tests erfolgte mit SPSS 22/24 (IBM, Chicago, IL, USA). Da die Ergebnisse nicht normalverteilt sind, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test angewendet mit dem Genotyp und der Behandlungsgruppe als unabhängigen Variablen. Die graphische Darstellung erfolgte mit Excel 2016 und SPSS 22/24. p -Werte $< 0,05$ werden als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Untersuchungen des olfaktorischen Epithels (OE) und des Bulbus olfactorius (OB) sowie die Ergebnisse des Buried Pellet Riechtests für die unbehandelten und behandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäuse gezeigt.

4.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen im olfaktorischen Epithel

4.1.1. Ergebnisse der H.E.-Übersichtsfärbung im OE

Für die Untersuchung des immunhistochemischen Profils der Riechschleimhaut wurden von jeder der sechs Behandlungsgruppen jeweils 4 Tiere untersucht. Zur Orientierung wurden Frontalschnitte in einem Intervall von 500 µm mit Hämatoxylin und Eosin (H.E.) gefärbt (Abbildung 12).

Die lichtmikroskopische Untersuchung der H.E.-Färbung zeigt deutliche morphologische Unterschiede im OE der unbehandelten *Npc1*^{-/-} (Abbildung 12B). Die typische, säulenartige Anordnung der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) der *Npc1*^{+/+} Mäuse ist bei den unbehandelten *Npc1*^{-/-} kaum noch erkennbar (Abbildung 12A). Stattdessen scheint die sonst so regelmäßige Struktur ungeordnet und lückenartig und die Anzahl der ORNs und Basalzellen reduziert.

Weiterhin ist erkennbar, dass sowohl die Kombi- als auch die HPβCD-Behandlung eine deutlich besser erhaltene Morphologie in den *Npc1*^{-/-} Mäusen aufweisen (Abbildung 12D, F). Eine Unterscheidung zwischen behandelten *Npc1*^{-/-} und behandelten oder unbehandelten *Npc1*^{+/+} ist kaum noch möglich.

In den gesunden *Npc1*^{+/+} Kontrollen sind keine therapiebedingten Veränderungen in der H.E.-Übersichtsfärbung nachweisbar.

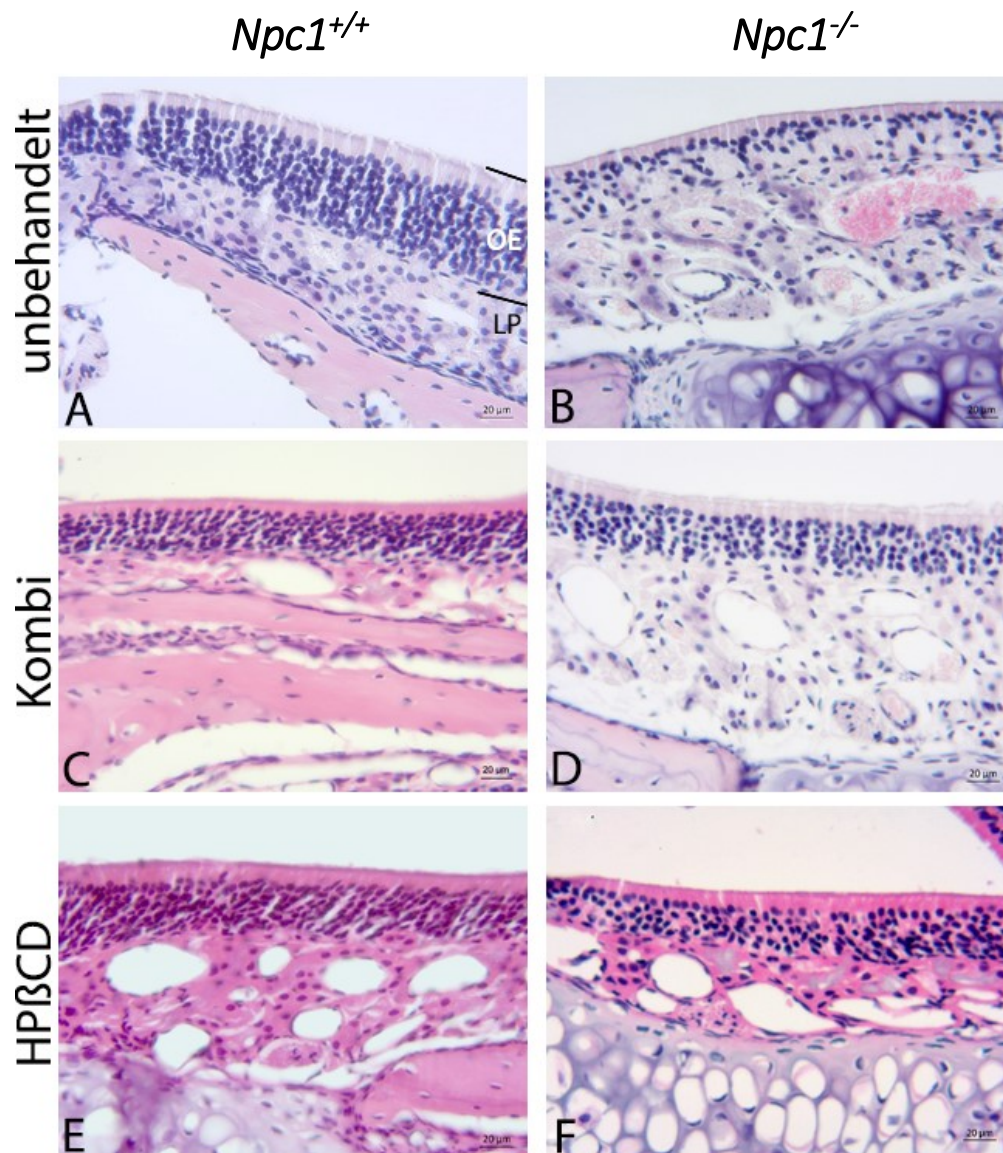


Abbildung 12 Ergebnisse der H.E. Übersichtsfärbung im OE. Das OE der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse zeigt eine typisch säulenartige Struktur mit zahlreichen ORN (A). Unbehandelte *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen deutliche morphologische Veränderungen mit einer sichtbar reduzierten Zelldichte und einer kaum erhaltenen Schichtung (B). Sowohl die Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} (D) als auch HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse (F) weisen eine signifikante Verbesserung der Morphologie auf und sind kaum noch von den Kontrollen zu unterscheiden. Die Kombi- (C) und HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} (E) demonstrieren ein normales Profil. (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.)

4.1.2. Ergebnisse der BrdU - Reaktivität im OE

Um mögliche Veränderungen in der zellulären Homöostase im OE festzustellen, wurden die proliferierenden BrdU(+) Zellen ausgewertet. Die lichtmikroskopische Auswertung zeigt BrdU(+) Zellen im gesamten OE: im Bereich der Basalzellen, der ORNs und im Bereich der Stützzellen (Abbildung 13).

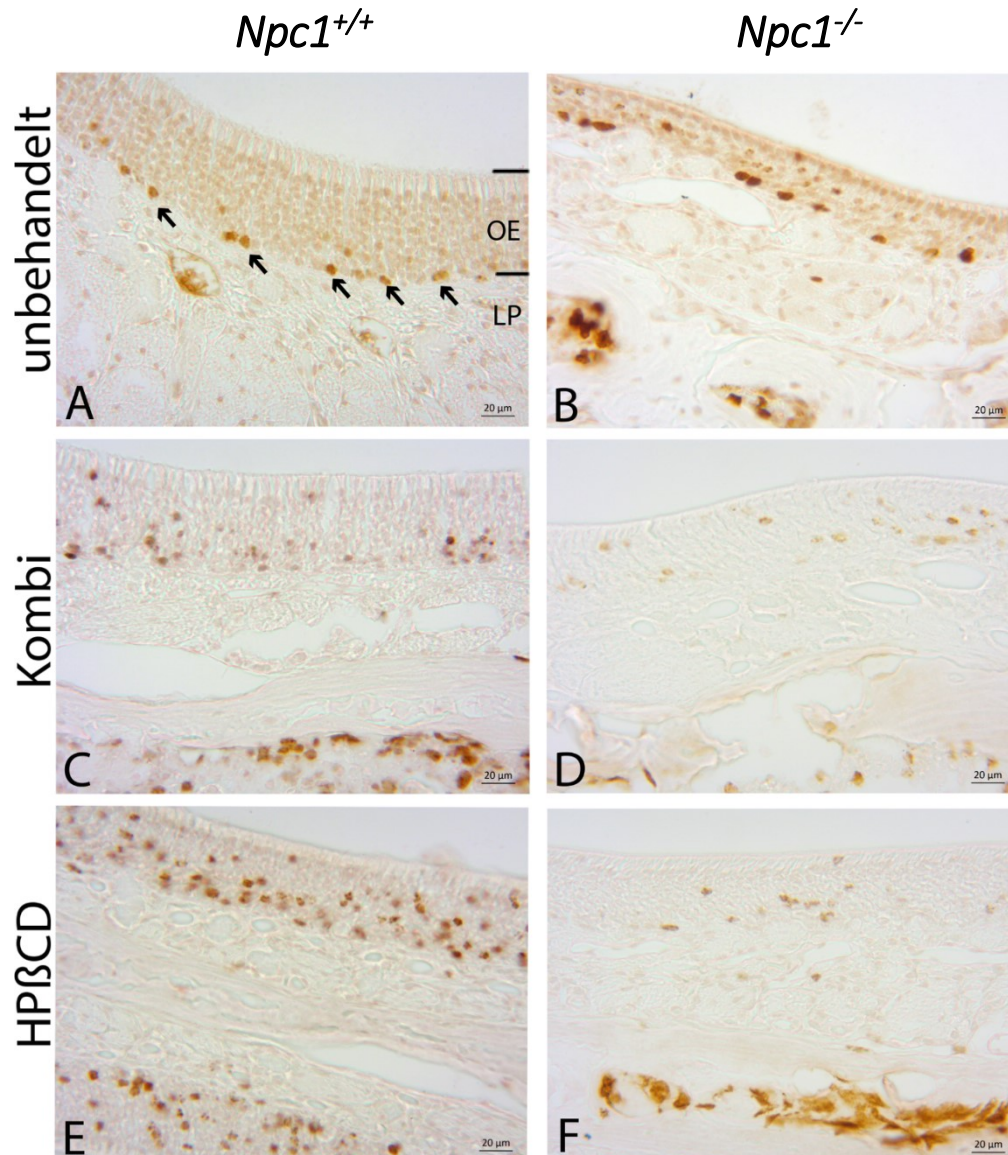


Abbildung 13 Immunhistochemischer Nachweis von BrdU(+) proliferierenden Zellen im OE. Proliferierende Zellen der unbedeuteten *Npc1*^{+/+} Mäuse (A) befinden sich überwiegend im basalen Drittel des OE (Pfeile). (B) In den unbedeuteten *Npc1*^{-/-} Mäusen sind die BrdU(+) Zellen in Clustern im basalen Bereich, aber auch im Bereich der ORN und Stützzellen. Die Höhe des Epithels ist sichtbar reduziert. Die Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} (D) und die HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse (F) weisen eine erhöhte Proliferationsaktivität auf mit weniger clusterartigen Ansammlungen, sondern regelmäßig verteilten BrdU(+) Zellen. Sowohl die Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} (C) als auch die HPβCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen zeigen in allen epithelialen Schichten eine deutlich höhere Proliferationsaktivität auf als die unbedeuteten Kontrollen (A). (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.)

In den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen sind die proliferierenden Zellen perlschnurartig angeordnet und überwiegend im basalen Drittel des OE zu finden. Nur gelegentlich treten sie auch im Bereich der ORN und Stützzellen auf (Abbildung 13A). Im Gegensatz dazu zeigen die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse eine clusterartige Verteilung BrdU(+) Zellen im basalen Bereich, aber auch in der Region der ORN und Stützzellen (Abbildung 13B).

Beide Behandlungsformen scheinen die Proliferationsaktivität im OE der *Npc1*^{-/-} Mäuse zu steigern (Abbildung 13D, F). Im Gegensatz zu den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen verteilen sich hier die BrdU(+) Zellen deutlich regelmäßiger und treten nicht mehr in Clustern auf. Weiterhin sind sie in allen Bereichen des OE zu finden.

Eine ähnliche Tendenz ist auch in beiden Gruppen der behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen zu erkennen (Abbildung 13C, E). Die Behandlungen scheinen die Proliferations- und Regenerationsaktivität der Basalzellen, ORN und Stützzellen zu steigern. Dies ist ein Indiz für einen therapieinduzierten Einfluss und eine Beeinträchtigung der Homöostase des OE in gesunden *Npc1*^{+/+} Mäusen.

Für eine genauere Beurteilung der Proliferationsaktivität wurden zusätzlich, zur qualitativen Einschätzung, die BrdU(+) Zellen im OE von allen sechs Behandlungsgruppen quantifiziert. Die Ergebnisse der BrdU-Quantifizierung im OE sind in Abbildung 14 und Tabelle 3 dargestellt.

Die Anzahl der neu gebildeten, BrdU(+) Zellen der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse beträgt 17.417 ± 1.317 Zellen/mm³ und wurde als Referenz für den Vergleich mit den anderen Behandlungsgruppen als 100 % definiert (Tabelle 3).

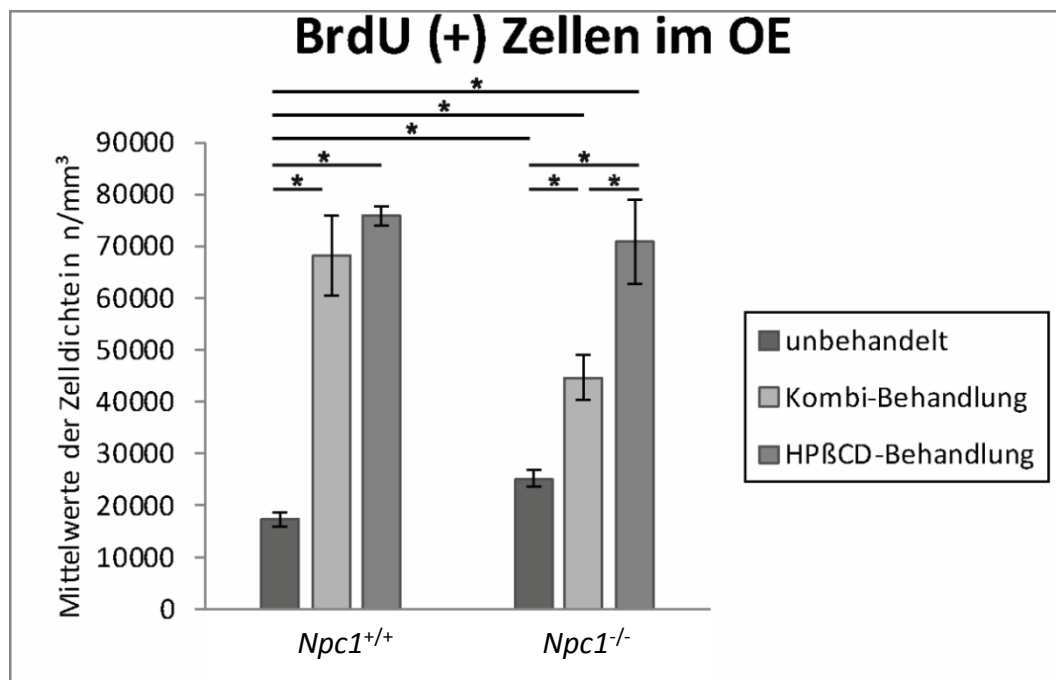


Abbildung 14 Quantitative Analyse der Proliferationsaktivität im OE zeigt sowohl in den unbehandelten, Kombi- und HPβCD- behandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen einen deutlichen Anstieg der Anzahl der neu gebildeten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen. Beide Behandlungen resultieren in einer deutlichen Proliferationssteigerung sowohl bei den *Npc1*^{+/+} als auch

den *Npc1*^{-/-} Mäusen. Die HPßCD-Behandlung bewirkt eine höhere Proliferationsdichte als die Kombi-Therapie bei den *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. *p*-Werte < 0,05 werden als signifikant gewertet (* *p* < 0,05). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1*^{+/+} n=4, Kombi *Npc1*^{+/+} n=4, HPßCD *Npc1*^{+/+} n=4, unbehandelte *Npc1*^{-/-} n=4, Kombi *Npc1*^{-/-} n=4, HPßCD *Npc1*^{-/-} n=4)

Im Vergleich dazu ist die Proliferationsaktivität in allen anderen Gruppen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abbildung 14). Die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen eine signifikante Erhöhung der BrdU(+) Zellen auf 145% (25.180 ± 1.605 Zellen/mm³; *p* = 0,021), während beide Behandlungsstrategien eine drastische Steigerung der Proliferation aufweisen, mit 157% mehr BrdU(+) Zellen in den Kombi-behandelten Mäusen (44.693 ± 4.191 Zellen/mm³; *p* = 0,021) und sogar 305% in den HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen (70.558 ± 8.159 Zellen/mm³; *p* = 0,021).

Der Vergleich der unbehandelten und behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse untereinander zeigt ebenfalls eine signifikant erhöhte Proliferationsaktivität in diesen Tieren nach beiden Therapiemodellen. So konnte im Vergleich mit den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen eine Erhöhung der BrdU(+) Zelldichte um 19.513 Zellen/mm³ (~ 77,5%; *p* = 0,021) in den Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen und um 45.379 Zellen/mm³ (~ 180%; *p* = 0,021) in den HPßCD-behandelten Mäusen nachgewiesen werden.

Überraschenderweise konnte die Steigerung der Proliferationsaktivität nicht nur in den *Npc1*^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden, sondern ebenso in den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen. So zeigen die Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse eine fast vierfach erhöhte, therapieinduzierte Proliferation (67.972 ± 7.694 Zellen/mm³; *p* = 0,021). Dies wird sogar noch von den HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen mit einer Steigerung auf 436% (75.871 ± 1.865 Zellen/mm³; *p* = 0,021) übertroffen.

Der Vergleich beider Behandlungsmodelle miteinander zeigt, dass die Monotherapie mit HPßCD in den *Npc1*^{-/-} Mäusen ca. 58% mehr proliferierende Zellen induziert als die Kombinationsbehandlung (*p* = 0,021). Eine ähnliche Tendenz ist auch bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen zu erkennen, jedoch ohne statistische Signifikanz.

4.1.3. Ergebnisse der OMP Reaktivität im OE

Nachdem die Ergebnisse der BrdU(+) proliferierenden Zellen deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, sollte im Anschluss auch der Einfluss des Genotyps und der Behandlung auf die Anzahl der reifen ORN untersucht werden. Das olfaktorische Markerprotein (OMP) gilt dabei als zuverlässiger Marker und soll eine wesentliche Rolle in der olfaktorischen Signalübertragung spielen (Margolis 1982; Baldisseri et al. 2002). Das OE der unbehandelten *Npc1*^{+/+} zeigt in der immunhistochemischen Reaktion gegen OMP eine dichte Schicht von hoch organisierten OMP(+) reifen ORNs, welche sich deutlich von der angrenzenden Basal- und Stützzellschicht abgrenzen (Abbildung 15A). In der Lamina

propria lassen sich bei allen Mäusen OMP(+) Nervenfaserbündel erkennen, die zum OB projizieren. Im Gegensatz zu den BrdU(+) Markierungen zeigt die lichtmikroskopische Auswertung von OMP keine therapieinduzierten Unterschiede in den *Npc1*^{+/+} Mäusen (Abbildung 15C, E).

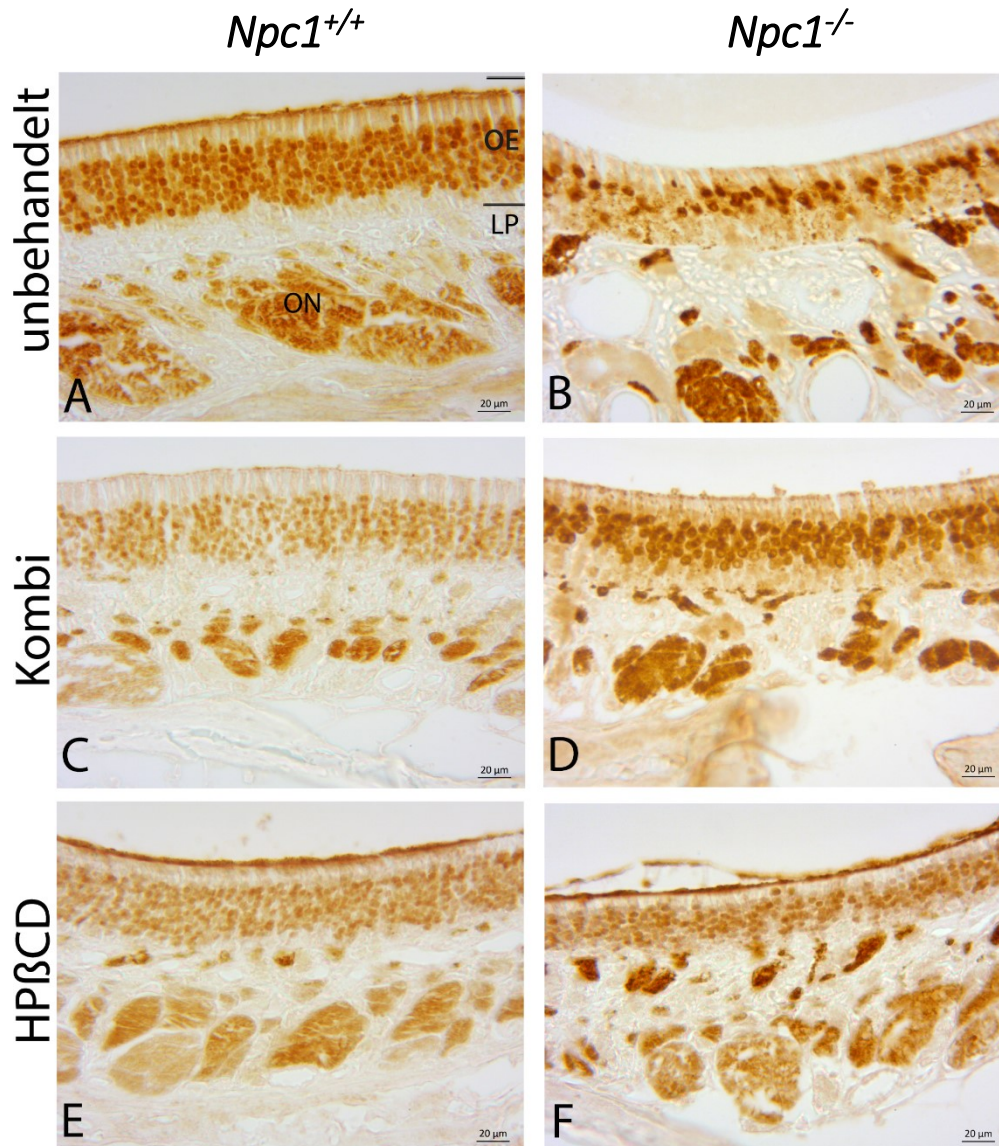


Abbildung 15 Immunreaktivität von OMP(+) reifen ORN im OE. (A) Unbehandelten *Npc1*^{+/+} zeigen eine ausgeprägte Schicht säulenartig angeordneter reifen ORN. Die basale Zellschicht lässt sich dabei gut von den reifen ORN-Schicht und der Lamina propria (LP) unterscheiden. (B) Bei den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse sind nur noch wenige ORN im oberen Drittel nachweisbar; die Struktur wirkt lückenhaft. Sowohl die Kombi- (D) als auch die HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse (F) besitzen wieder eine deutliche Schicht von noch erhaltenen oder bereits ersetzten reifen ORN. Dennoch ist die basale Zellschicht nicht eindeutig abgrenzbar und die Zellen sind weniger organisiert. Im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen zeigen die Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} (C) und die HPβCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (E) keine Veränderungen in der OMP(+) Immunreaktivität. (ON: olfaktorisches Nervenfaserbündel in der LP. Skalierungsbalken entspricht 20 µm.)

Im Gegensatz dazu zeigen die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse eine deutliche Reduktion der reifen ORN (Abbildung 15B). Die wenigen noch nachweisbaren reifen ORN befinden sich

überwiegend im oberen Drittel des sichtbar schmalen OE. Die typische Säulenstruktur ist einer unregelmäßigen Zellverteilung und großen lückenhaften Zwischenräumen gewichen. Sowohl die Kombi- als auch die HPβCD-Behandlung zeigen jedoch einen deutlichen Effekt auf die Morphologie in *Npc1*^{-/-} Mäusen (Abbildung 15D, E). Das OE der behandelten *Npc1*^{-/-} zeigt wieder eine ausgeprägte Schicht von entweder erhaltenen und/oder bereits ersetzten reifen ORN. Allerdings ist die Zellanordnung weniger regelmäßig strukturiert und deutliche Abgrenzung der reifen ORN von Basal- und Stützzellen nicht so deutlich wie bei den Kontrollen.

Da die lichtmikroskopische Auswertung allein keine eindeutige Beurteilung des therapeutischen Erfolgs der jeweiligen Behandlungen ermöglicht, wurden die OMP(+) Zellen zusätzlich quantifiziert und so die Zelldichte der reifen ORN für die sechs Behandlungsgruppen bestimmt (Abbildung 16, Tabelle 3).

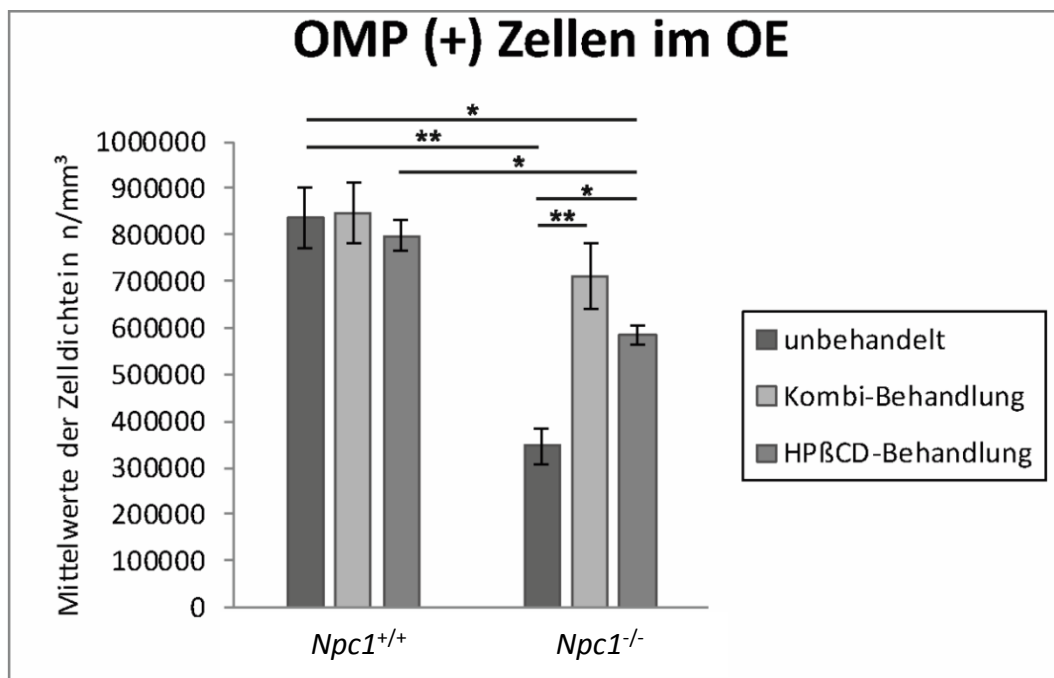


Abbildung 16 Ergebnisse der Quantifizierung der OMP(+) Zellen im OE. Die Quantifizierung der OMP(+) Zellen im OE der sechs Behandlungsgruppen zeigt eine signifikante Reduktion der reifen ORN in den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen, welche durch beide Therapieformen teilweise kompensiert werden kann. Die Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} profitieren dabei mehr von der Therapie als die HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse. In den gesunden *Npc1*^{+/+} Mäusen kann kein therapieinduzierter Effekt auf die Anzahl der reifen ORN nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM angegeben. *p*-Werte < 0,05 werden als signifikant gewertet (* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1*^{+/+} n=5, Kombi *Npc1*^{+/+} n=6, HPβCD *Npc1*^{+/+} n=6, unbehandelte *Npc1*^{-/-} n=5, Kombi *Npc1*^{-/-} n=6, HPβCD *Npc1*^{-/-} n=4)

Dabei dienten die unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse mit einer definierten Zelldichte von 100 % (836.392 ± 63.784 Zellen/mm³) als Referenz. Die Anzahl der reifen ORN in den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen ist mit 41 % (346.129 ± 37.812 Zellen/mm³) signifikant reduziert (*p* = 0,009).

Auch wenn keine der beiden Behandlungsstrategien den neuronalen Verlust im OE der *Npc1*^{-/-} Mäuse gänzlich kompensieren kann, resultieren sie in einer höheren OMP(+) Zelldichte mit 85% bei den Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen (709.729 ± 69.558 Zellen/mm³; *p* = 0,100) und 70 % bei den HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen (594.852 ± 43.952 Zellen/mm³; *p* = 0,014). Im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{-/-} zeigen die Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} eine Steigerung der OMP(+) Zelldichte um 363.600 Zellen/mm³ (~ 105 %; *p* = 0,006) und die HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} um 238.139 Zellen/mm³ (~ 69 %; *p* = 0,014). Auch wenn die Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen statistisch nicht signifikant sind, ist dies ein möglicher Hinweis darauf, dass die Kombi-Therapie einen größeren Effekt auf den Erhalt der reifen ORN hat als die Behandlung mit HPßCD allein.

Im Gegensatz zu der deutlich erhöhten Proliferationsaktivität in den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen können bei der OMP(+) Zelldichte keine therapieinduzierten Unterschiede nachgewiesen werden.

4.1.4. Ergebnisse der Cas-3 Reaktivität im OE

Um mögliche Veränderungen der Apoptoseaktivität detektieren zu können, wurden die Tiere auch auf ihre Immunreaktivität gegen Caspase-3 (Cas-3) untersucht (Abbildung 17).

Die lichtmikroskopische Beurteilung zeigt nur sehr wenige Cas-3(+) apoptotische Zellen im Bereich der ORN und in der Basalzellschicht von unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen, konnte jedoch nicht im Bereich der Stützzellen nachgewiesen werden (Abbildung 17A). Im Gegensatz dazu zeigen die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse eine sichtbar gesteigerte Apoptoseaktivität mit regelmäßig und teilweise clusterartig verteilten Cas-3(+) Zellen in der ORN- und Basalzellschicht, nicht aber in der Stützzellschicht (Abbildung 17B).

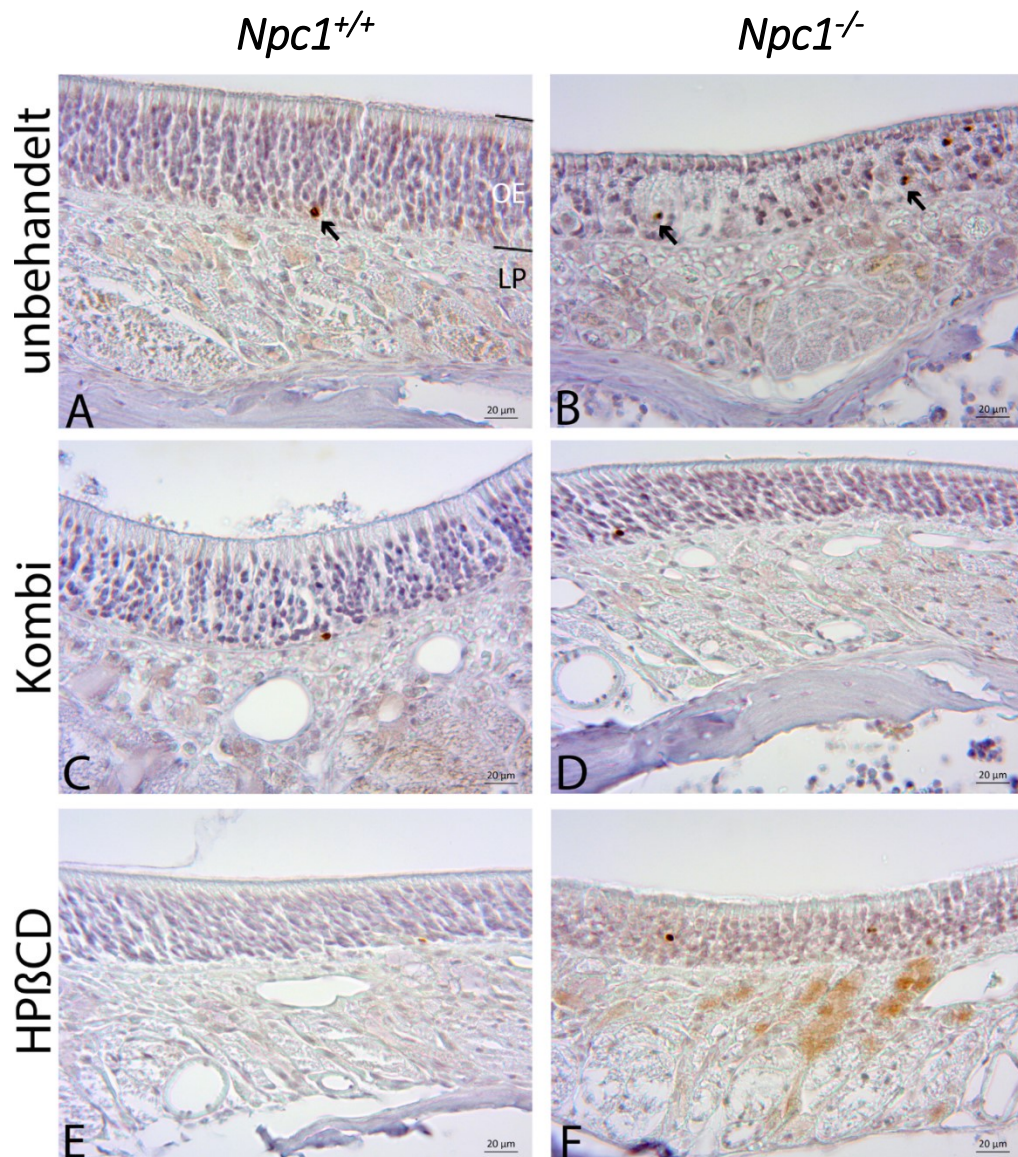


Abbildung 17 Immunhistochemischer Nachweis Cas-3(+) apoptotischer Zellen im OE. Die unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (A) zeigen nur gelegentlich apoptotische Zellen (Pfeil), während die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse (B) eine deutlich gesteigerte Immunreaktivität gegen Cas-3 im Bereich der Basalzellen und ORN zeigt. Im Vergleich dazu zeigen die Kombi-behandelten (D) und HPßCD-behandelten (F) *Npc1*^{-/-} Mäuse eine Reduktion der Apoptoseaktivität. Die lichtmikroskopische Auswertung zeigt keine erkennbaren Veränderungen der Cas-3 Reaktivität in den Kombi- (C) oder HPßCD-behandelten (E) *Npc1*^{+/+} Mäusen. (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.)

Die Monotherapie mit HPßCD allein scheint in den *Npc1*^{-/-} Mäusen eine höhere Apoptoseaktivität aufzuweisen als die Kombi-Therapie (Abbildung 17D, F). Eine ähnliche Tendenz zeigt sich auch bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen. Während die Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} sich nicht von den unbehandelten *Npc1*^{+/+} unterscheiden, zeigen die HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse Cas-3(+) Zellen zwar in größeren, jedoch regelmäßigen Abständen (Abbildung 17C, E). Aufgrund der dennoch nur vereinzelt auftretenden apoptotischen Zellen ist diese Tendenz in den lichtmikroskopischen Aufnahmen nicht erkennbar. Für eine eindeutige Beurteilung der Apoptoseaktivität wurden daher die Cas-3(+) Zellen in allen sechs Gruppen quantifiziert (Abbildung 18, Tabelle 3).

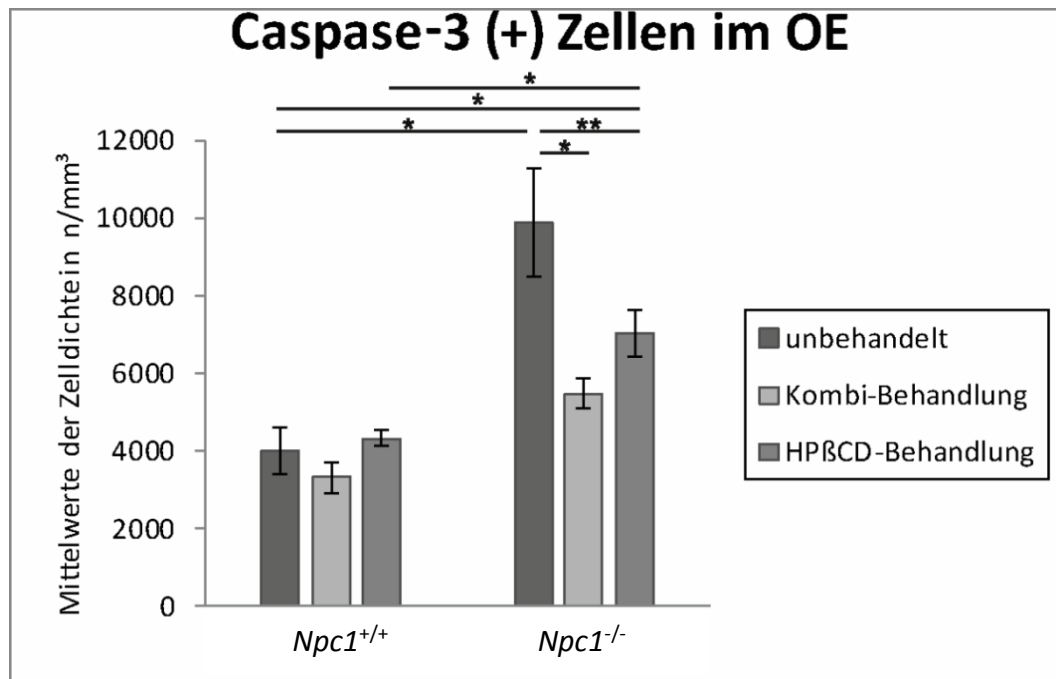


Abbildung 18 Ergebnisse der Quantifizierung der Cas-3(+) Zellen im OE. Die Quantifizierung der Cas-3(+) apoptotischen Zellen im OE der sechs Behandlungsgruppen zeigt eine signifikante Erhöhung der Apoptoseaktivität im OE der unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse, welche durch beide Behandlungen deutlich reduziert wird. Die Kombi-Behandlung ist dabei effektiver als die HPβCD-Behandlung. Die behandelten *Npc1*^{+/+} zeigen keine signifikanten, therapieinduzierten Veränderungen in der Apoptoserate. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM angegeben. *p*-Werte < 0,05 werden als signifikant gewertet (* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1*^{+/+} n=4, Kombi *Npc1*^{+/+} n=4, HPβCD *Npc1*^{+/+} n=5, unbehandelte *Npc1*^{-/-} n=5, Kombi *Npc1*^{-/-} n=5, HPβCD *Npc1*^{-/-} n=6)

Basierend auf einer gemittelten Cas-3(+) Zelldichte von 3.999 ± 596 Zellen/mm³ (100 %) im OE der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse konnte eine nahezu 2,5-fach erhöhte Apoptoseaktivität in den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen (9.879 ± 1.373 Zellen/mm³, *p* = 0,014) nachgewiesen werden (Tabelle 3). Auch nach Behandlung zeigen die *Npc1*^{-/-} Mäuse eine weiterhin höhere Apoptoserate als ihre Kontrollen mit 37 % mehr Cas-3(+) Zellen in den Kombi- (5.471 ± 397 Zellen/mm³, *p* = 0,142) und sogar 75 % mehr in den HPβCD-behandelten Tieren (7.016 ± 591 Zellen/mm³, *p* = 0,019). Dennoch reduzieren beide Behandlungen die Anzahl der apoptotischen Zellen in *Npc1*^{-/-} Mäusen signifikant im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen. So konnte eine Reduktion der Cas-3(+) Zelldichte um 4.408 Zellen/mm³ (~ 55 %, *p* = 0,009) bei den Kombi-behandelten und 2.863 Zellen/mm³ (~ 71 %; *p* = 0,045) bei den HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigen die Behandlungen keinen signifikanten Effekt auf die Apoptoseaktivität in *Npc1*^{+/+} Mäusen mit 83 % (3.327 ± 387 Zellen/mm³; *p* = 0,773) nach Kombi- und 108 % (4.316 ± 215 Zellen/mm³; *p* = 0,327) in den HPβCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen. Obwohl bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsstrategien nachgewiesen wurde, zeigen die HPβCD-behandelten *Npc1*^{+/+}

Mäuse mit einer um 989 Zellen/mm³ (~ 29 %) größeren Cas-3(+) Zelldichte eine signifikante Steigerung im Vergleich zu den Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen ($p = 0,050$).

Behandlungsgruppe	BrdU (Zellen/mm ³ ± SEM) (Stichprobengröße)	OMP (Zellen/mm ³ ± SEM) (Stichprobengröße)	Cas-3 (Zellen/mm ³ ± SEM) (Stichprobengröße)
unbehandelte <i>Npc1</i> ^{+/+}	17.417 ± 1.317 (4)	836.392 ± 63.784 (5)	3.999 ± 596 (4)
unbehandelte <i>Npc1</i> ^{-/-}	25.180 ± 1.605 (4)	346.129 ± 37.812 (5)	9.879 ± 1.373 (5)
Kombi-behandelte <i>Npc1</i> ^{+/+}	67.972 ± 7.694 (4)	844.819 ± 65.313 (6)	3.327 ± 387 (4)
Kombi-behandelte <i>Npc1</i> ^{-/-}	44.693 ± 4.191 (4)	709.729 ± 69.558 (6)	5.471 ± 397 (5)
HPßCD-behandelte <i>Npc1</i> ^{+/+}	75.871 ± 1.865 (4)	797.470 ± 32.568 (6)	4.316 ± 215 (5)
HPßCD-behandelte <i>Npc1</i> ^{-/-}	70.558 ± 8.159 (4)	584.268 ± 21.134 (4)	7.016 ± 591 (6)

Tabelle 3 Übersicht der Quantifizierungsergebnisse im OE. Die Zelldichten der proliferierenden BrdU(+), der reifen OMP(+) ORN und der apoptotischen Cas-3(+) Zellen zeigen in Abhängigkeit des Genotyps und der Behandlung Veränderungen. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM der Zelldichte in Zellen/mm³ angegeben.

4.1.5. Ergebnisse der GAP43 Reaktivität im OE

In Ergänzung zu den reifen ORN wurden auch die GAP43(+) unreifen ORN immunhistochemisch analysiert. Die qualitative Beurteilung dieser unreifen Neurone zeigt zahlreiche und regelmäßig verteilte GAP43(+) Zellen im basalen Drittel des OE der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Kontrollen (Abbildung 19A). Im Gegensatz dazu scheinen sich die unreifen ORN bei den unbehandelten *Npc1*^{+/+} mehr im mittleren Drittel zu befinden und sind eher clusterartig verteilt (Abbildung 19B).

Da auch nach den beiden Behandlungsstrategien weder die *Npc1*^{+/+} (Abbildung 19C, E) noch die *Npc1*^{-/-} Mäuse (Abbildung 19D, F) sichtbare Unterschiede in der Immunreaktivität der GAP43(+) unreifen Neurone zeigen, wurde auf eine quantitative Analyse dieser Zellpopulation verzichtet.

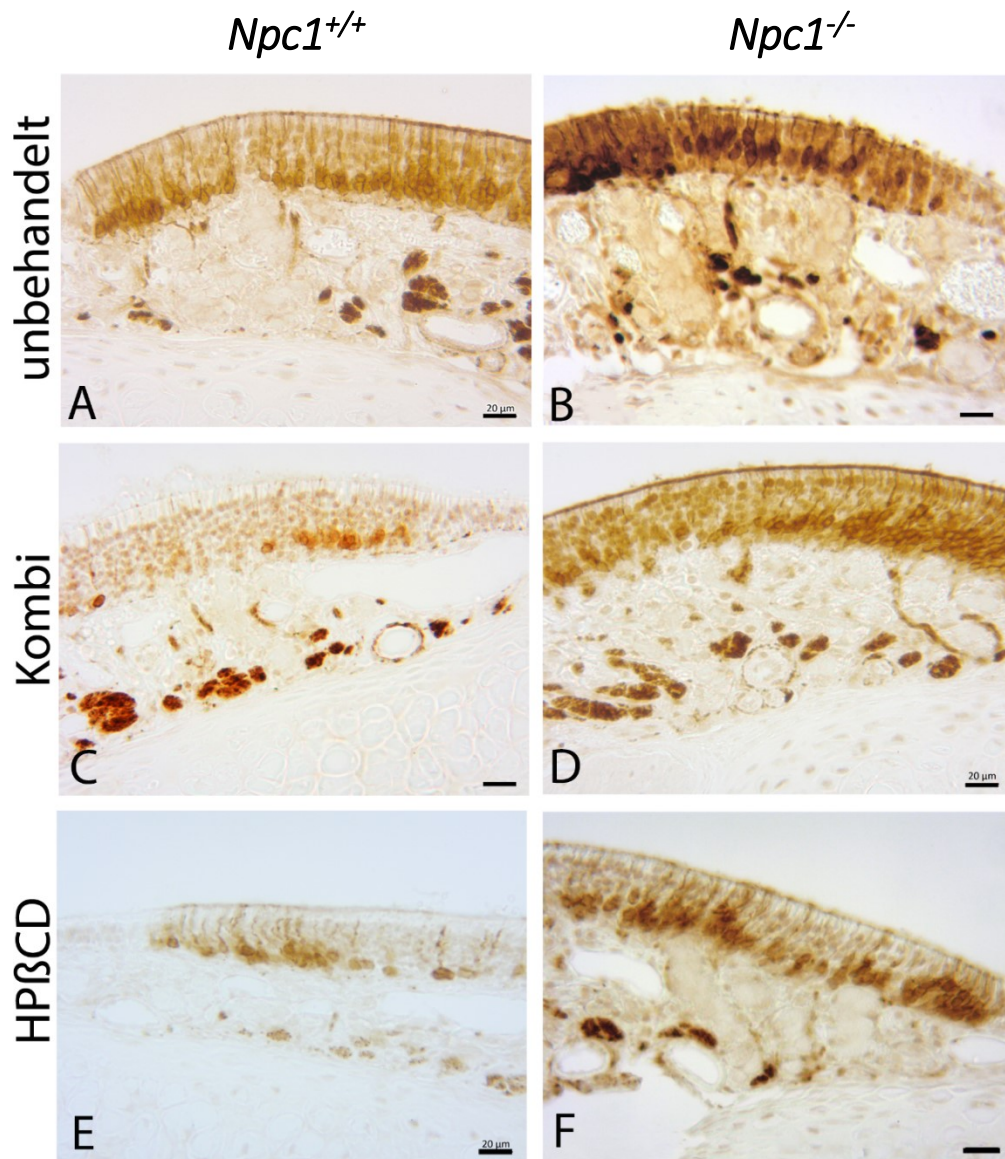


Abbildung 19 Immunreaktivität der GAP43(+) unreifen ORN. Die neugebildeten GAP43(+) Zellen sind in den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen regelmäßig im basalen Bereich verteilt (**A**). In den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen scheint diese Verteilung eher clusterartig angehäuft und mehr in den mittleren Bereich verschoben (**B**). Dieser Effekt kann durch die Kombi- (**D**) und die HPßCD-Behandlung (**F**) verbessert werden. In den gesunden *Npc1*^{+/+} Mäusen konnte weder nach der Kombi- (**C**) noch der HPßCD-Behandlung (**E**) ein therapieinduzierter Effekt gezeigt werden. (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.)

4.1.6. Ergebnisse der CathD Reaktivität im OE

Cathepsin D (CathD) ist ein Marker für die lysosomale Aktivität und wird innerhalb des OE unbehandelter *Npc1*^{-/-} Mäuse sehr deutlich in Form von Makrophagen-ähnlichen Zellen exprimiert (Abbildung 20B).

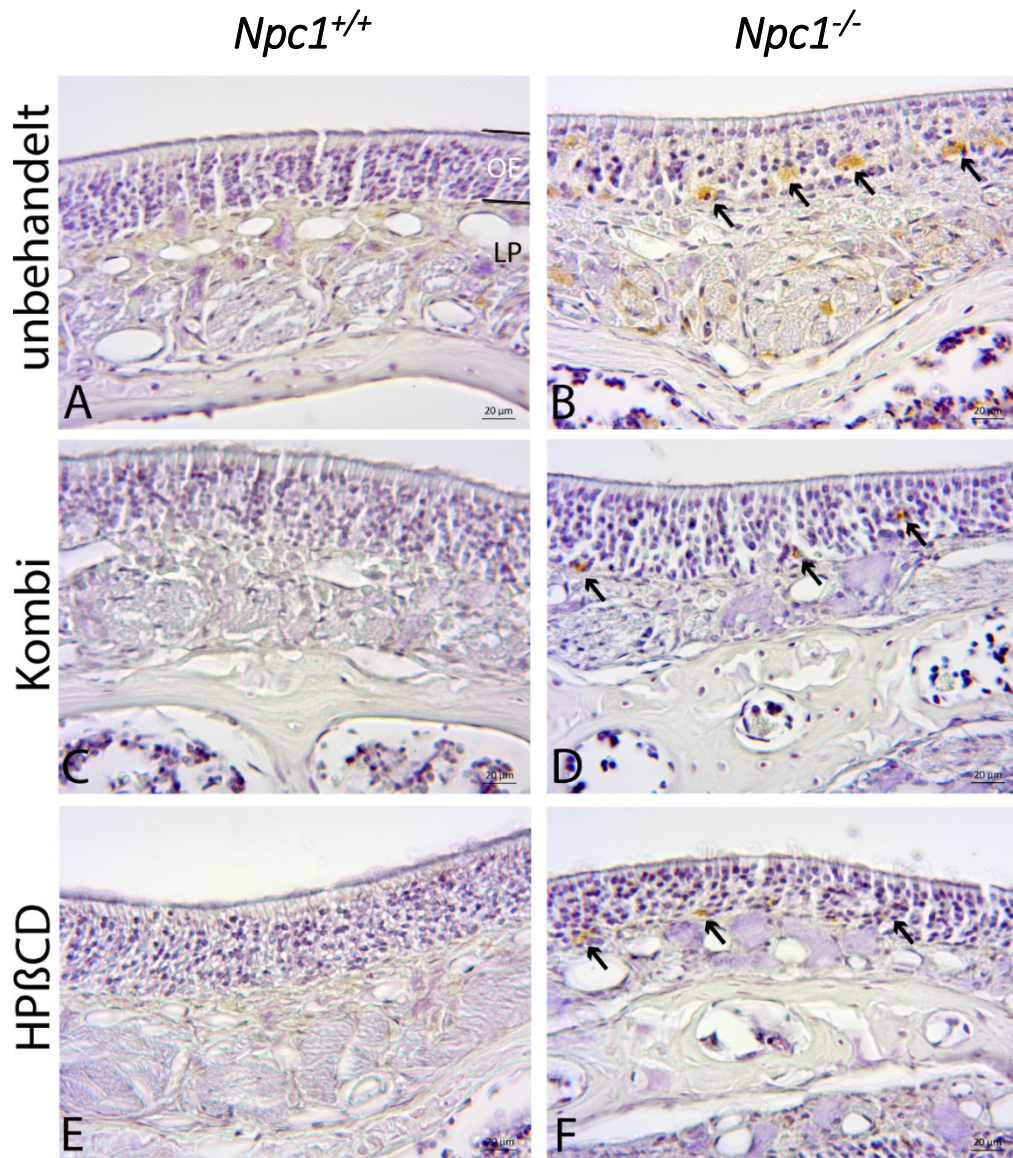


Abbildung 20 Immunhistochemischer Nachweis von CathD im OE. Weder in den unbehandelten (A) noch in den Kombi- (C) und HPβCD- behandelten (E) *Npc1*^{+/+} Mäusen konnte CathD nachgewiesen werden. Stattdessen zeigten die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse regelmäßig verteilt große, CathD(+) Makrophagen-ähnliche Zellen (B), welche überwiegend in der basalen Schicht auftreten (Pfeile). Sowohl die Kombi- (D) als auch die HPβCD-behandelten (F) *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen zwar weiterhin in regelmäßigen Abständen diese Einschlüsse, allerdings weniger häufig und in deutlich kleinerem Umfang (Pfeile). Ein Unterschied in der CathD-Immunreaktivität zwischen beiden Therapieformen kann nicht beobachtet werden. (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.)

Im Gegensatz dazu kann bei den gesunden Kontrollen nahezu keine Immunreaktivität nachgewiesen werden, weder in den unbehandelten noch in den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen (Abbildung 20A, C, E).

In den *Npc1*^{-/-} Mäusen führt die Behandlung zu einer sichtbar geringeren CathD-Reaktivität. Hier treten die CathD(+) Zellen weiterhin regelmäßig, aber nicht mehr so häufig und deutlich kleiner auf (Abbildung 20D, F). Ein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsstrategien konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen im Bulbus olfactorius (OB)

4.2.1. Ergebnisse der H.E.-Übersichtsfärbung im OB

Als Übersichtsfärbung wurden analog zum OE Frontalserienschnitte des Bulbus olfactorius (OB) in einem Intervall von 500 µm mit H.E. gefärbt (Abbildung 21).

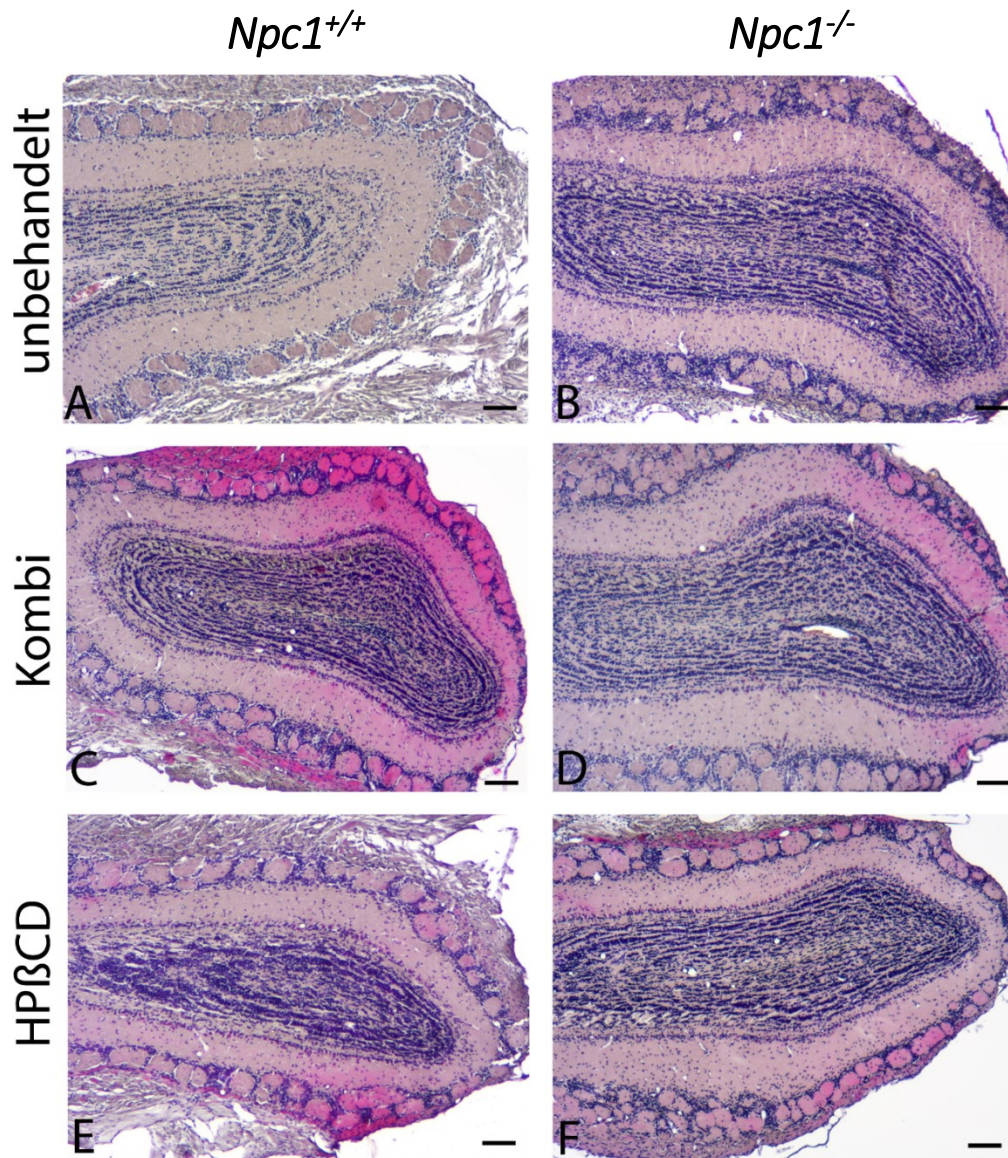


Abbildung 21 Ergebnisse der H.E. Übersichtsfärbung im OB. Der OB der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (A) zeigt den typischen Schichtaufbau beginnend von außen mit der Nervenfaserschicht (ONL), der glomerulären Schicht (GL), der externen plexiformen Schicht (EPL), der Mitralzellschicht (MCL), der internen plexiformen Schicht (IPL) und der Körnerzellschicht (GCL) im Zentrum. Dieser Aufbau ist ohne morphologische Veränderungen sowohl in den unbehandelten *Npc1*^{-/-} (B) als auch in den behandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen (C – F) erkennbar. (Skalierungsbalken entspricht 100 µm.)

Die lichtmikroskopische Auswertung zeigt in allen sechs Gruppen den typischen Schichtaufbau beginnend von außen mit der Nervenfaserschicht (ONL) über die glomeruläre

Schicht (GL), der externen plexiformen Schicht (EPL), der Mitralzellschicht (MCL), gefolgt von der internen plexiformen Schicht (IPL) und der Körnerzellschicht (GCL) im Zentrum. Im Gegensatz zum OE konnten bei dieser Übersichtsfärbung keine morphologischen Unterschiede nachgewiesen werden.

4.2.2. Ergebnisse der BrdU - Reaktivität im OB

Nachdem die Proliferationsaktivität im OE deutliche Unterschiede zeigte, sollte nun auch der Einfluss von Genotyp und Behandlung auf die Anzahl der proliferierenden BrdU(+) Zellen im OB untersucht werden (Abbildung 22).

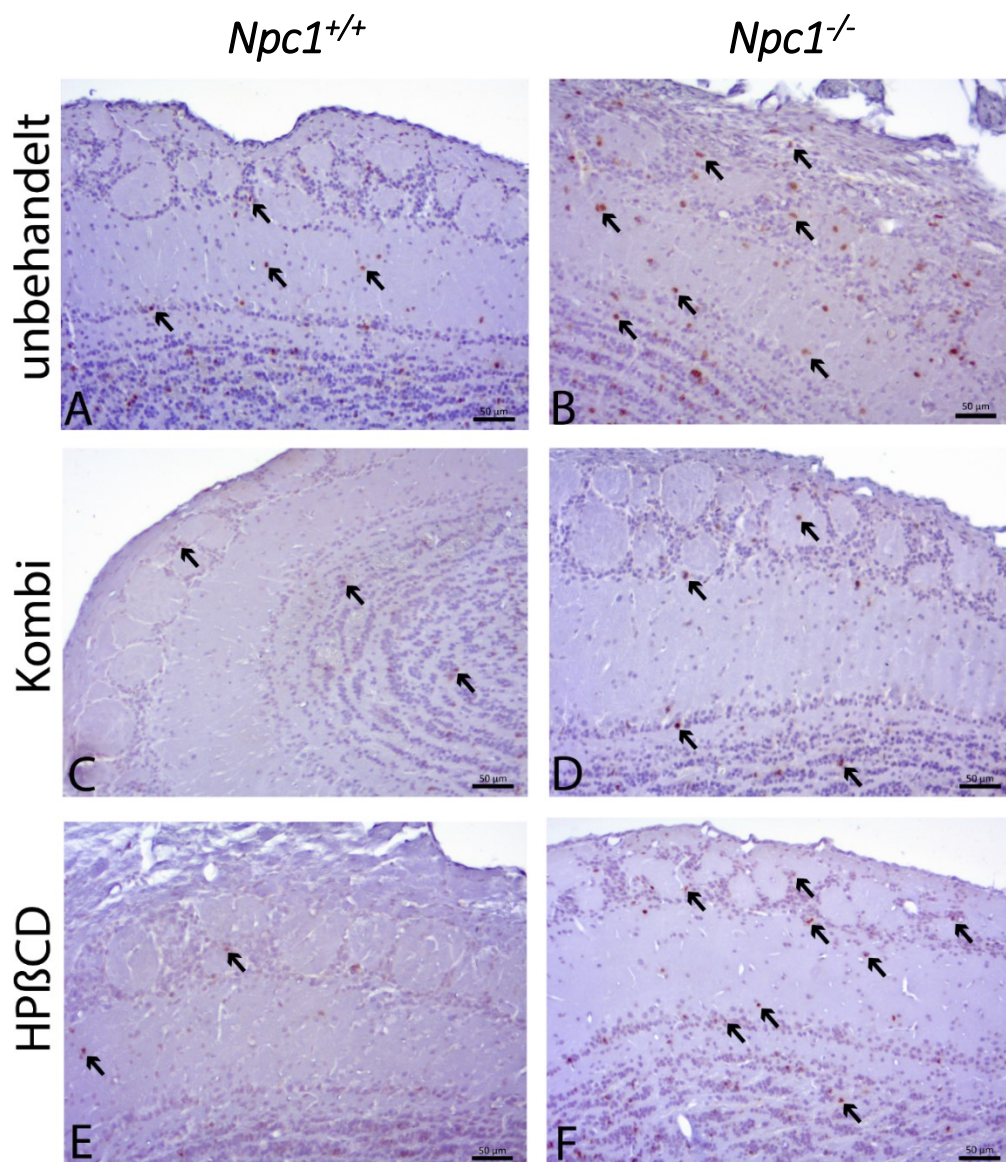


Abbildung 22 Immunhistochemischer Nachweis von BrdU(+) proliferierenden Zellen im OB. Im OB der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (A) sind in allen Schichten regelmäßig proliferierende BrdU(+) Zellen nachweisbar (Pfeile). In den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen zeigt sich eine deutliche Proliferationssteigerung (B), welche durch die Kombi-Behandlung (D) nahezu normalisiert wird. Die HPβCD-Behandlung (F) hat bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen hingegen keinen nennenswerten Effekt.

lichtmikroskopische Beurteilung der beiden Behandlungen hat im OB der *Npc1^{+/+}* Kontrollen keinen erkennbaren Effekt auf die Anzahl der BrdU(+) Zellen (**C, E**). (Skalierungsbalken entspricht 50 μm .)

In den unbehandelten *Npc1^{+/+}* Mäusen können zahlreiche proliferierende Zellen nachgewiesen werden, wobei der Großteil in der Körnerzellschicht (GCL) und weniger in der GL, EPL, MCL und IPL zu finden ist (Abbildung 22A). Im Gegensatz dazu zeigen die unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse eine deutlich gesteigerte Proliferationsaktivität in allen Schichten (Abbildung 22B), welche jedoch nach der Kombi-Behandlung (Abbildung 22D) wieder annähernd normalisiert wird. Dieser regulatorische Effekt kann überraschenderweise nicht bei den HP β CD-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen beobachtet werden, bei denen die BrdU(+)-Immunreaktivität weiterhin deutlich erhöht ist (Abbildung 22F). In den behandelten *Npc1^{+/+}* Mäusen wurde morphologisch weder nach der Kombi- noch nach der HP β CD-Behandlung ein therapiebedingter Einfluss auf die Proliferation festgestellt (Abbildung 22C, E).

Für eine quantitative Beurteilung der Proliferationsaktivität wurden die BrdU(+) Zellen eines Bulbus je Tier gezählt und die gemittelte Zelldichte bestimmt (Abbildung 23, Tabelle 4). Unbehandelte *Npc1^{+/+}* Mäuse zeigen im OB eine durchschnittliche Proliferationsdichte von 77.327 ± 9.109 Zellen/ mm^3 , welche als Referenz mit 100 % definiert wurde. Bei den unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen wurde mit 109.557 ± 204.46 Zellen/ mm^3 eine Erhöhung um 41,7 % ($p = 0,253$) nachgewiesen.

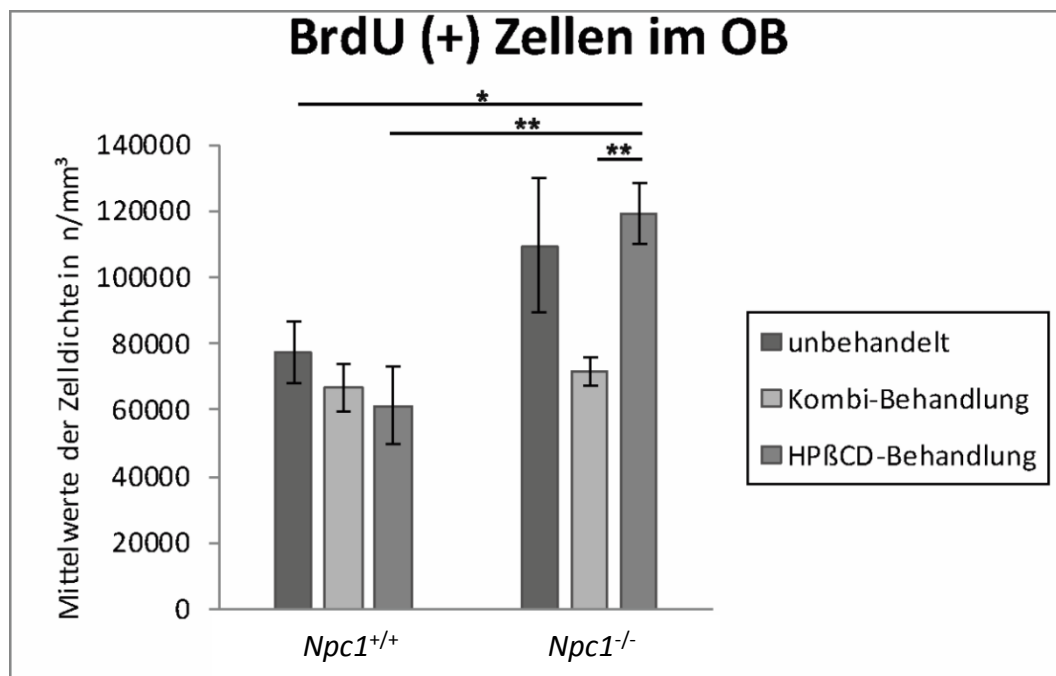


Abbildung 23 Quantitative Analyse der Proliferationsaktivität im OB. Die unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse zeigen einen sichtbaren Anstieg der proliferierenden Zellen, welche zwar durch die Kombi-Behandlung, nicht aber durch die HP β CD-Behandlung normalisiert werden kann. In den *Npc1^{+/+}* Mäusen kann kein therapiebedingter Effekt auf die Proliferationsaktivität nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. p -Werte $< 0,05$ werden als signifikant

gewertet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1*^{+/+} n=6, Kombi *Npc1*^{+/+} n=9, HPßCD *Npc1*^{+/+} n=5, unbehandelte *Npc1*^{-/-} n=7, Kombi *Npc1*^{-/-} n=5, HPßCD *Npc1*^{-/-} n=7)

Diese Steigerung kann durch die Kombi-Behandlung nahezu normalisiert werden. So zeigen die Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse eine Proliferationsdichte von 71.779 ± 4.405 Zellen/mm³ und somit 34,5 % weniger BrdU(+) Zellen als die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse ($p = 0,291$). Dies entspricht mit einer Abweichung von 7,2 % nahezu dem Niveau der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen ($p = 0,584$). Überraschenderweise führt die Behandlung mit HPßCD allein zu keiner nennenswerten Reduktion der Proliferation in den *Npc1*^{-/-} Mäusen. Tatsächlich wurden hier 118.954 ± 9.298 Zellen/mm³ erfasst, was einer signifikanten Steigerung der Proliferation um 54 % im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen entspricht ($p = 0,032$) und einer geringen, wenngleich nicht signifikanten Erhöhung um 8,6 % im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen ($p = 0,565$). Stattdessen ist der Unterschied zwischen den beiden Behandlungsmodellen bei den *Npc1*^{-/-} hoch signifikant ($p = 0,004$) mit 65,7 % weniger proliferierenden Zellen in den Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen.

Bei den *Npc1*^{+/+} Mäusen zeigen die Behandlungen hingegen eher eine Reduktion der Proliferationsaktivität. So wurden in den Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen 66.757 ± 6.877 Zellen/mm³ und 61.378 ± 11.404 Zellen/mm³ in den HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen detektiert. Dies entspricht im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen einer Minderung um 13,7 % ($p = 0,289$) bzw. 20,6 % ($p = 0,361$) und zeigt keine statistische Signifikanz. Folglich wurde kein therapieinduzierter Effekt auf die Proliferation im OB von *Npc1*^{+/+} Mäusen nachgewiesen.

Für den Vergleich der Proliferationsaktivität von OB und OE wurde die mittlere Dichte der BrdU(+) Zellen im OB für die verschiedenen Behandlungsgruppen auf 100% gesetzt und mit der relativen Proliferationsdichte im OE verglichen (Abbildung 24).

Dabei zeigt sich, dass die Proliferationsaktivität im OB der unbehandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäuse unabhängig vom Genotyp um das 4,4fache höher ist als im OE. Dieses deutlich größere Regenerationspotential wird bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen durch beide Behandlungen ähnlich stark auf 160% nach der Kombi- und 170% nach der HPßCD-Behandlung reduziert. Dennoch ist die Dichte der BrdU(+) Zellen im OB bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen weiterhin höher als im OE.

Im Gegensatz dazu zeigen die Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen eine mit 98% annähernd gleiche Proliferationsdichte im OB. Besonders deutlich wird der Unterschied bei den HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen, bei denen die Proliferationsdichte im OB sogar um 20% geringer ist als im OE.

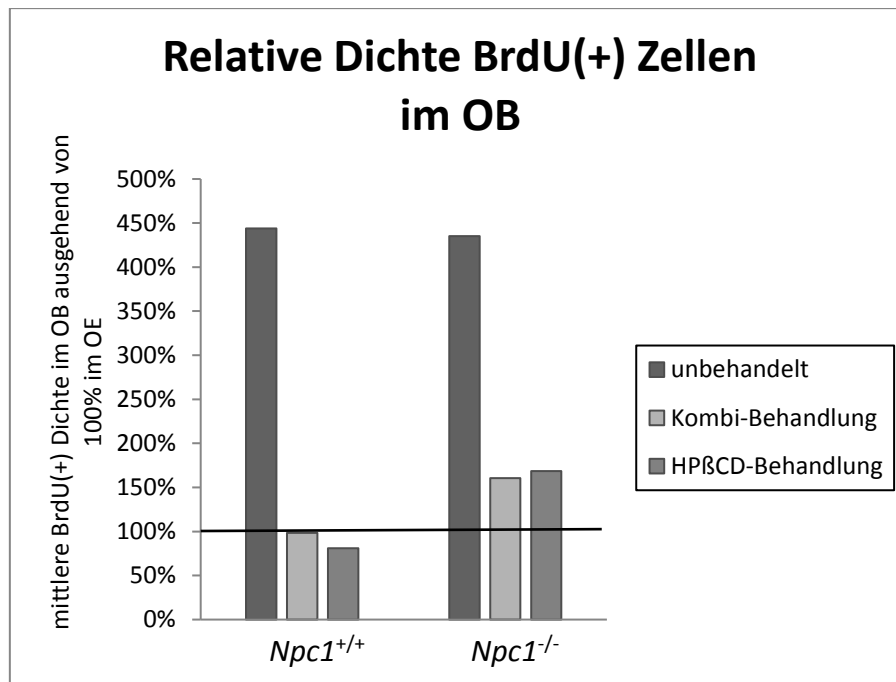


Abbildung 24 Vergleich der Proliferationsdichte von OE und OB. Für den Vergleich der Proliferationsaktivität zwischen dem OE und dem OB wurde die Anzahl der BrdU(+) proliferierenden Zellen im OE auf 100 % gesetzt (horizontale schwarze Linie) und mit der relativen Dichte der BrdU(+) Zellen des OB verglichen. In den unbehandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} ist die Anzahl der neu gebildeten Zellen je mm³ unabhängig vom Genotyp um das 4,4fache höher als im OE. In den *Npc1*^{-/-} Mäusen ist das Regenerationspotential im OB durch beide Behandlungen ähnlich stark auf 160% nach der Kombi- und 170% der BrdU(+) Zelldichte im Vergleich zum OE nach der HPβCD-Behandlung reduziert. Nur in den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen ist die Proliferationsdichte im OE höher als im OB.

4.2.3. Ergebnisse der Tyrosinhydroxylase (TH) - Reaktivität im OB

Basierend auf dem drastischen Verlust von reifen ORN im OE von *Npc1*^{-/-} Mäusen wurde die TH-Immunreaktivität der dopaminergen Neurone im OB untersucht (Abbildung 25).

Die lichtmikroskopische Auswertung zeigt eine deutliche TH(+) Reaktivität der GL in Form von Glomeruli und zahlreichen periglomerulären Zellen (PG) in den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen (Abbildung 25A). Die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen ebenfalls eine Immunreaktivität der GL, allerdings sind hier die einzelnen Glomeruli kaum voneinander abgrenzbar und weniger intensiv markiert (Abbildung 25B). Die Anzahl der TH(+) PG scheint nicht verändert.

Dieser pathologische Effekt wird durch beide Therapieformen gemindert. So zeigen sowohl die Kombi- als auch die HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} wieder eine bessere Abgrenzung der einzelnen Glomeruli und eine stärkere Immunreaktivität (Abbildung 25D, F). Die behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse zeigen ebenfalls eine deutliche Immunreaktivität der Glomeruli und zahlreiche TH(+) periglomeruläre Zellen (Abbildung 25C, E).

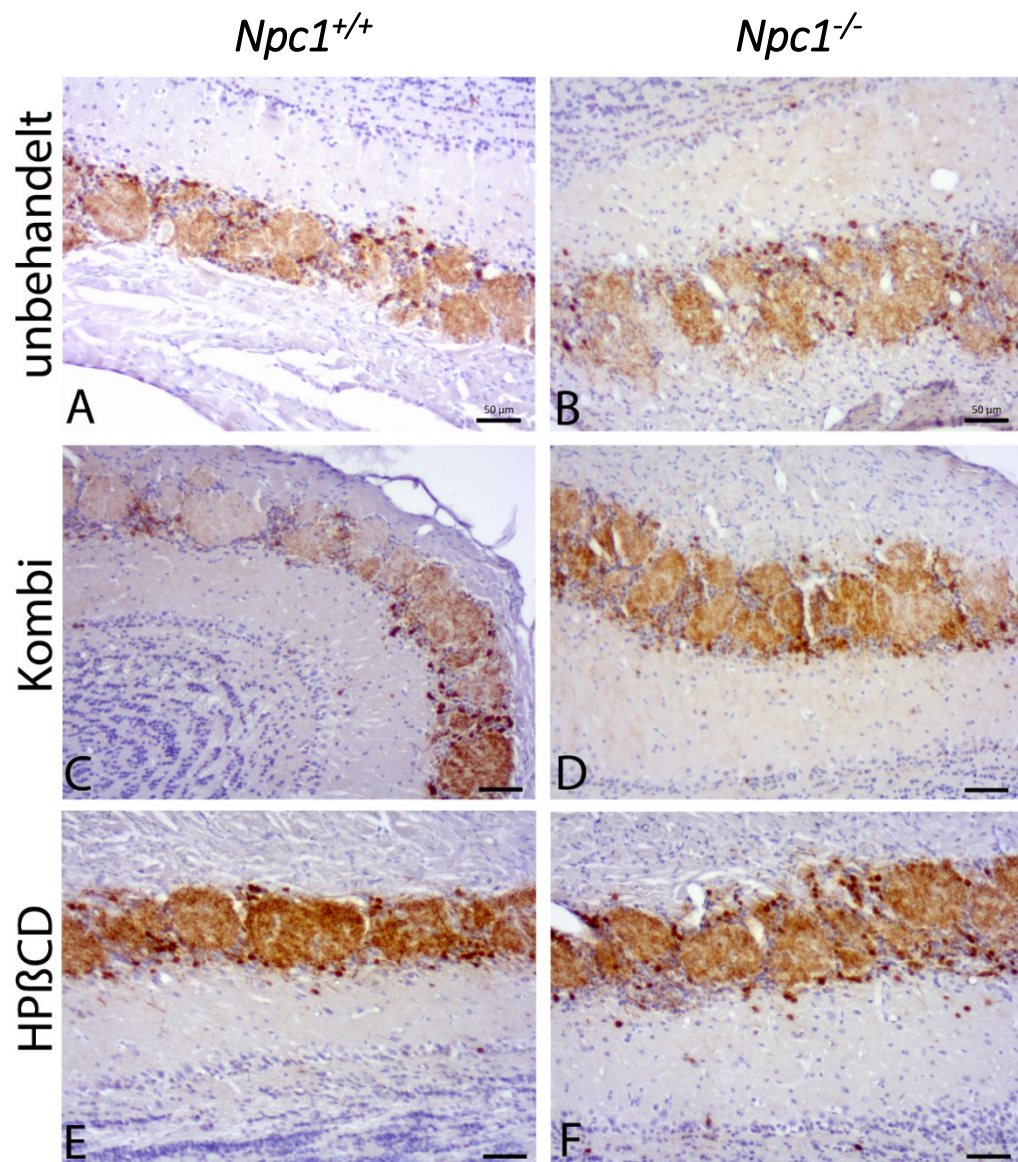


Abbildung 25 Immunreaktivität von TH(+) dopaminergen Interneuronen im OB. Die unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (**A**) zeigen eine deutliche TH(+) Immunreaktivität der perglomerulären Zellen und der Glomeruli. Letztere sind in den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen (**B**) sichtbar schwächer gefärbt und kaum voneinander abgrenzbar. Sowohl die Kombi- als auch die HPβCD-Behandlung zeigen eine Normalisierung der TH(+) Immunreaktivität in den *Npc1*^{-/-} Mäusen (**D, F**), während in den gesunden Kontrollen in der lichtmikroskopischen qualitativen Beurteilung keine eindeutigen Veränderungen zeigen (**C, E**). (Skalierungsbalken entspricht 50 µm.)

Für eine eindeutige Beurteilung der TH(+) Zellen wurden diese im unilateralen OB von je drei Tieren in allen sechs Gruppen zusätzlich quantifiziert (Abbildung 26, Tabelle 4).

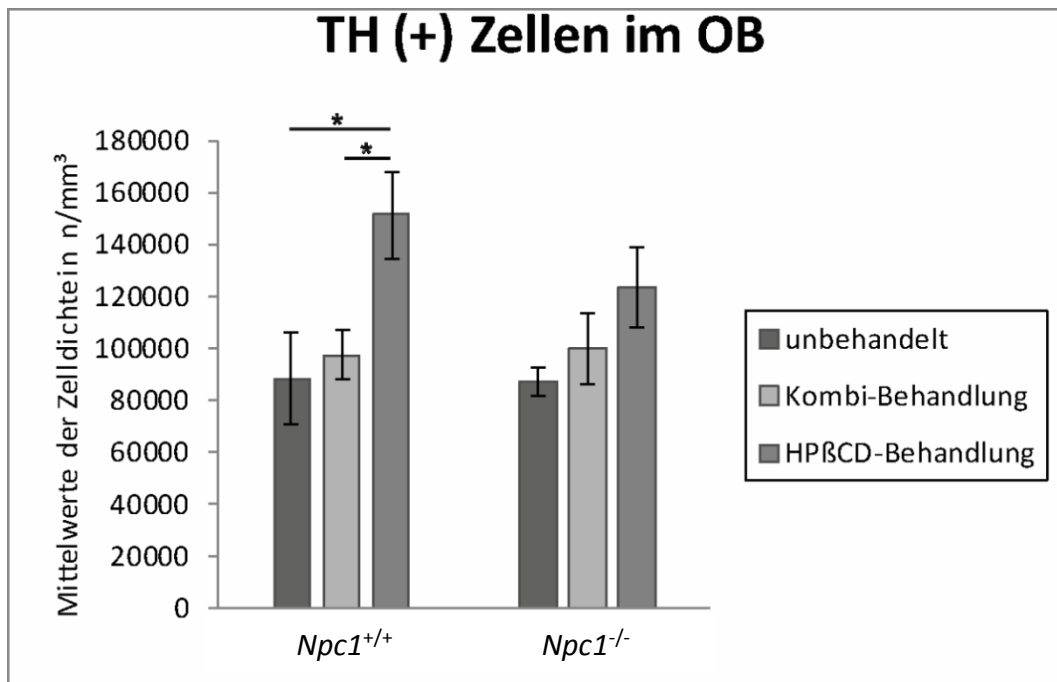


Abbildung 26 Quantitative Analyse der TH(+) dopaminergen Interneurone im OB. Überraschenderweise zeigen die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse keine Veränderung in der Anzahl der dopaminergen Interneurone im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen. Stattdessen zeigen sowohl die *Npc1*^{+/+} als auch die *Npc1*^{-/-} Mäuse nach der Kombi-Therapie eine nur leicht erhöhte Anzahl TH(+) Neurone. Im Gegensatz dazu kann in den HPβCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen ein signifikanter Anstieg der TH(+) Neurone nachgewiesen werden. Eine ähnliche Tendenz zeigen auch die HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM angegeben. *p*-Werte < 0,05 werden als signifikant gewertet (* *p* < 0,05). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1*^{+/+} n=3, Kombi *Npc1*^{+/+} n=3, HPβCD *Npc1*^{+/+} n=3, unbehandelte *Npc1*^{-/-} n=3, Kombi *Npc1*^{-/-} n=3, HPβCD *Npc1*^{-/-} n=3)

Die unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse haben eine gemittelte TH(+) PG Dichte von 88.419 ± 17.605 Zellen/mm³ und wurden als Referenzgruppe mit 100 % definiert. Mit 87.093 ± 5.202 Zellen/mm³ (98,5%, *p* = 0,827) ist die Anzahl der TH(+) PG in den unbehandelten *Npc1*^{-/-} nicht reguliert. Stattdessen zeigen die behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse eine leichte Erhöhung der TH(+) PG mit 99.714 ± 13.380 TH(+) Zellen/m³ (12,8 %, *p* = 0,827) nach der Kombi- und 123.253 ± 15.234 Zellen/mm³ (39,4 %, *p* = 0,127) nach der HPβCD-Behandlung. Trotz fehlender statistischer Signifikanz ist ein therapiebedingter Einfluss auf die TH(+)-Immunreaktivität nicht auszuschließen.

Diese Tendenz setzt sich auch bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen fort. Während die Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse eine um 10,1 % erhöhte TH(+) Zelldichte von 97.332 ± 9.652 Zellen/mm³ aufweisen, ist die Anzahl der TH(+) PG in den HPβCD-behandelten *Npc1*^{+/+} mit 151.096 ± 16.898 Zellen/mm³ signifikant um 70,9 % (*p* = 0,05) höher als in den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen. Beim Vergleich beider Behandlungen miteinander zeigen die *Npc1*^{+/+} Mäuse nach der HPβCD-Behandlung eine signifikant höhere TH(+) Zellzahl von 55,2% (*p* = 0,05), während der Unterschied bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen mit 23,6 % mehr TH(+) Zellen weniger eindeutig ist (*p* = 0,275).

Behandlungsgruppe	BrdU	TH
	(Zellen/mm ³ ± SEM) (Stichprobengröße)	(Zellen/mm ³ ± SEM) (Stichprobengröße)
unbehandelte <i>Npc1</i> ^{+/+}	77.326 ± 9.109 (6)	88.419 ± 17.605 (3)
unbehandelte <i>Npc1</i> ^{-/-}	109.557 ± 20.446 (7)	87.093 ± 5.202 (3)
Kombi-behandelte <i>Npc1</i> ^{+/+}	66.757 ± 6.878 (9)	97.332 ± 9.651 (3)
Kombi-behandelte <i>Npc1</i> ^{-/-}	71.779 ± 4.405 (5)	99.714 ± 13.380 (3)
HPβCD-behandelte <i>Npc1</i> ^{+/+}	61.378 ± 11.404 (5)	151.096 ± 16.898 (3)
HPβCD-behandelte <i>Npc1</i> ^{-/-}	118.954 ± 9.298 (7)	123.252 ± 15.234 (3)

Tabelle 4 Übersicht der Quantifizierungsergebnisse im OB. Die Zelldichten der proliferierenden BrdU(+) und der dopaminergen TH(+) Interneurone zeigen in Abhängigkeit des Genotyps und der Behandlung Veränderungen. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM der Zelldichte in Zellen/mm³ angegeben.

4.2.4. Ergebnisse der Iba1 - Reaktivität im OB

Iba1 ist ein Marker für die Mikroglia und steht in direktem Zusammenhang mit Inflammationsprozessen bei neurodegenerativen Erkrankungen. Während in den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen (Abbildung 27A) keine Iba1(+) Zellen nachgewiesen wurden, zeigen die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse eine deutliche Iba1-Immunreaktivität mit zahlreichen Zellen in der GCL, EPL und GL des OB (Abbildung 27B).

Diese Mikrogliose kann durch die Kombi-Behandlung der *Npc1*^{-/-} Mäuse sichtbar reduziert werden (Abbildung 27D). Überraschenderweise zeigt die Monotherapie mit HPβCD keine Verbesserung, sondern weiterhin zahlreiche Iba1(+) Zellen in der GCL, EPL und GL der *Npc1*^{-/-} Mäuse (Abbildung 27F).

Im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen zeigen behandelte *Npc1*^{+/+} Mäuse sowohl nach der Kombi- als auch nach der HPβCD-Behandlung Iba1(+) Zellen (Abbildung 27C, E). Dies könnte bedeuten, dass HPβCD keinen therapeutischen Effekt hat, sondern womöglich eine Mikrogliose induziert.

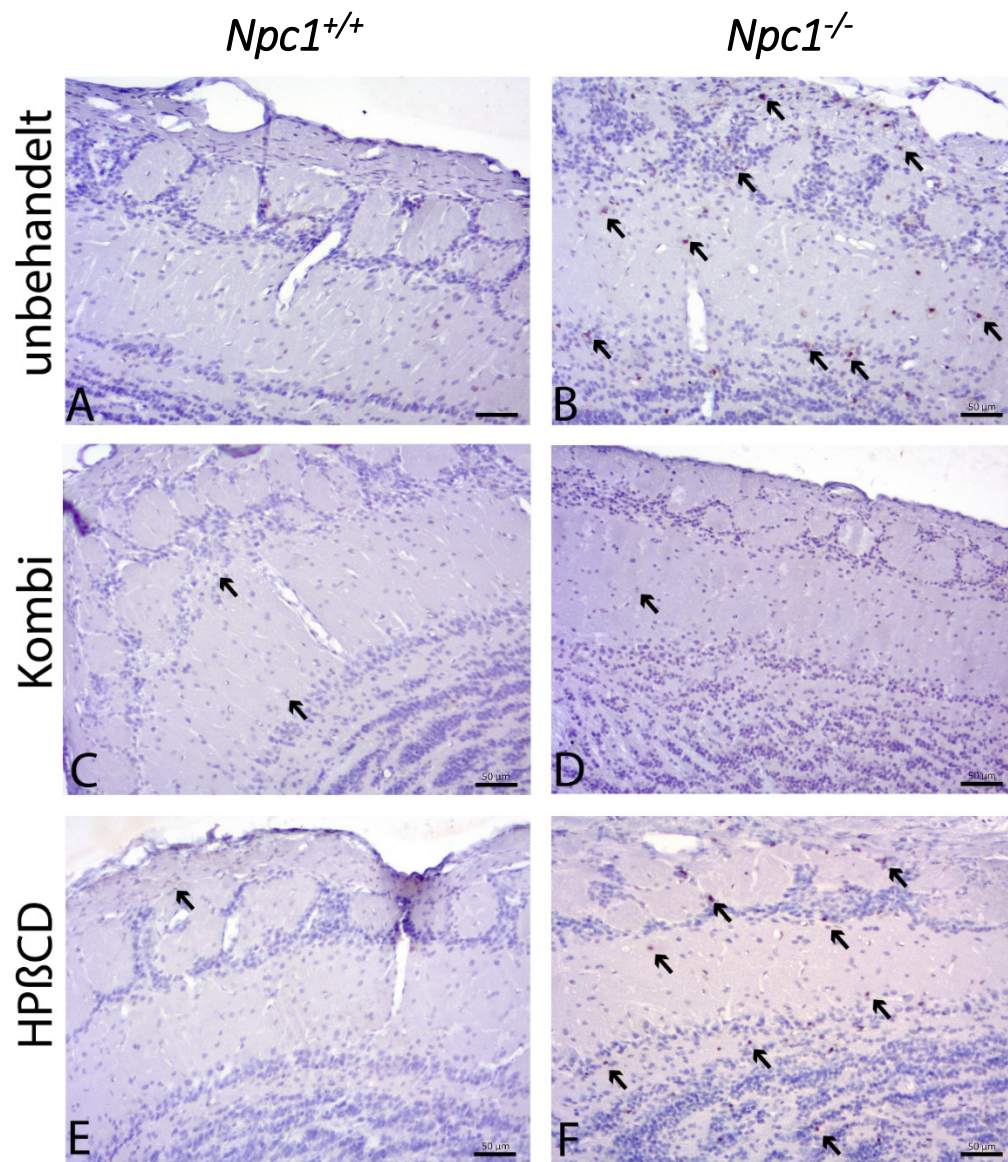


Abbildung 27 Nachweis der Iba1(+) Mikrogliaaktivität im OB. Im OB der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse konnten keine Iba1(+) Zellen nachgewiesen werden (**A**). Im Gegensatz dazu zeigen die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse eine deutliche Mikrogliose (**B**), die durch die Kombi-Behandlung (**D**) deutlich reduziert werden kann, nicht aber durch die HPßCD-Behandlung (**F**). Stattdessen zeigen sowohl die Kombi- als auch die HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse eine therapiinduzierte Mikroglia-Aktivierung (**C, E**). (Skalierungsbalken entspricht 50 µm.)

4.2.5. Ergebnisse der GFAP - Reaktivität im OB

Ähnlich wie bei der Mikroglia steht auch der Astroglia-Marker GFAP in Zusammenhang mit Entzündungsprozessen bei neurodegenerativen Erkrankungen.

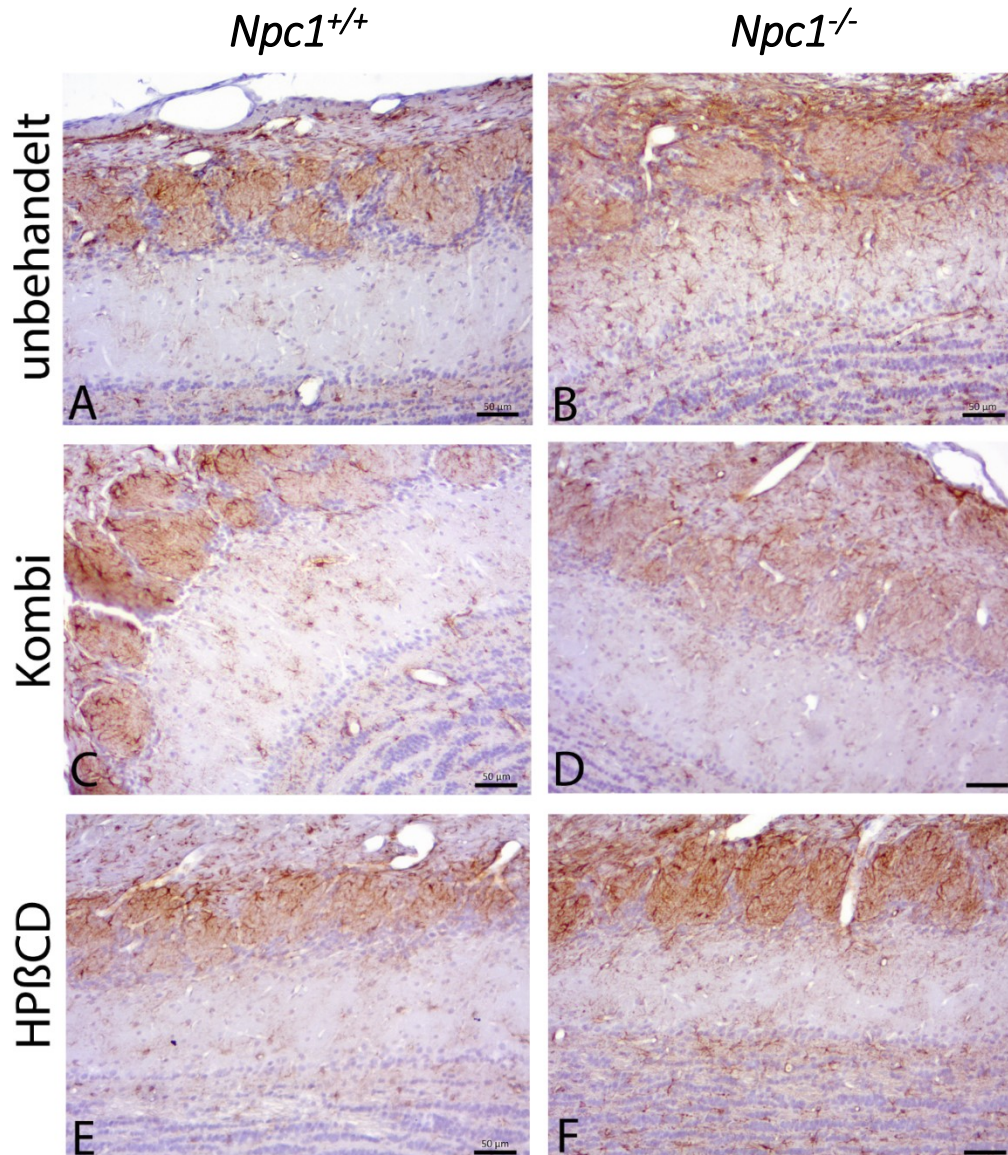


Abbildung 28 Nachweis der GFAP(+) Makrogliaaktivität im OB. Im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen (**A**) zeigen die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse eine so deutliche Astroglie, dass eine Abgrenzung der einzelnen Schichten des OB kaum noch möglich ist (**B**). Beide Therapien können diesen Effekt in den *Npc1*^{-/-} Mäusen verbessern, wobei die Kombi-Behandlung (**D**) einen größeren Benefit zu haben scheint als die HPβCD-Behandlung (**F**). Die behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse zeigen keinen Unterschied nach der Behandlung (**C**, **E**). (Skalierungsbalken entspricht 50 µm.)

Die lichtmikroskopische Auswertung der GFAP-Immunreaktivität (Abbildung 28) zeigt in den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen eine regelmäßige Verteilung von GFAP(+) Astrozyten in allen Schichten des OB, wobei sich die Immunreaktivität der ONL, GL und GCL deutlich von der EPL abgrenzen (Abbildung 28A). Die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen hingegen eine so starke Astroglie, dass eine Unterscheidung der einzelnen Schichten des OB kaum

noch möglich ist (Abbildung 28B). Dieser pathologische Effekt wird zwar sowohl durch die Kombi als auch durch die HPβCD-Behandlung sichtbar reduziert, allerdings kann die GFAP-Reaktivität nicht auf das Niveau der Kontrollen normalisiert werden (Abbildung 28D, F). Die HPβCD-Behandlung scheint jedoch weniger effektiv als die Kombi-Behandlung. Im Gegensatz zu der Iba1-Immunreaktivität kann bei GFAP kein therapieinduzierter Effekt in den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 28C, E).

4.2.6. Ergebnisse der Cas-3 - Reaktivität im OB

Auch im OB wurde die Immunreaktivität für den Apoptosemarker Cas-3 qualitativ ausgewertet (Abbildung 29).

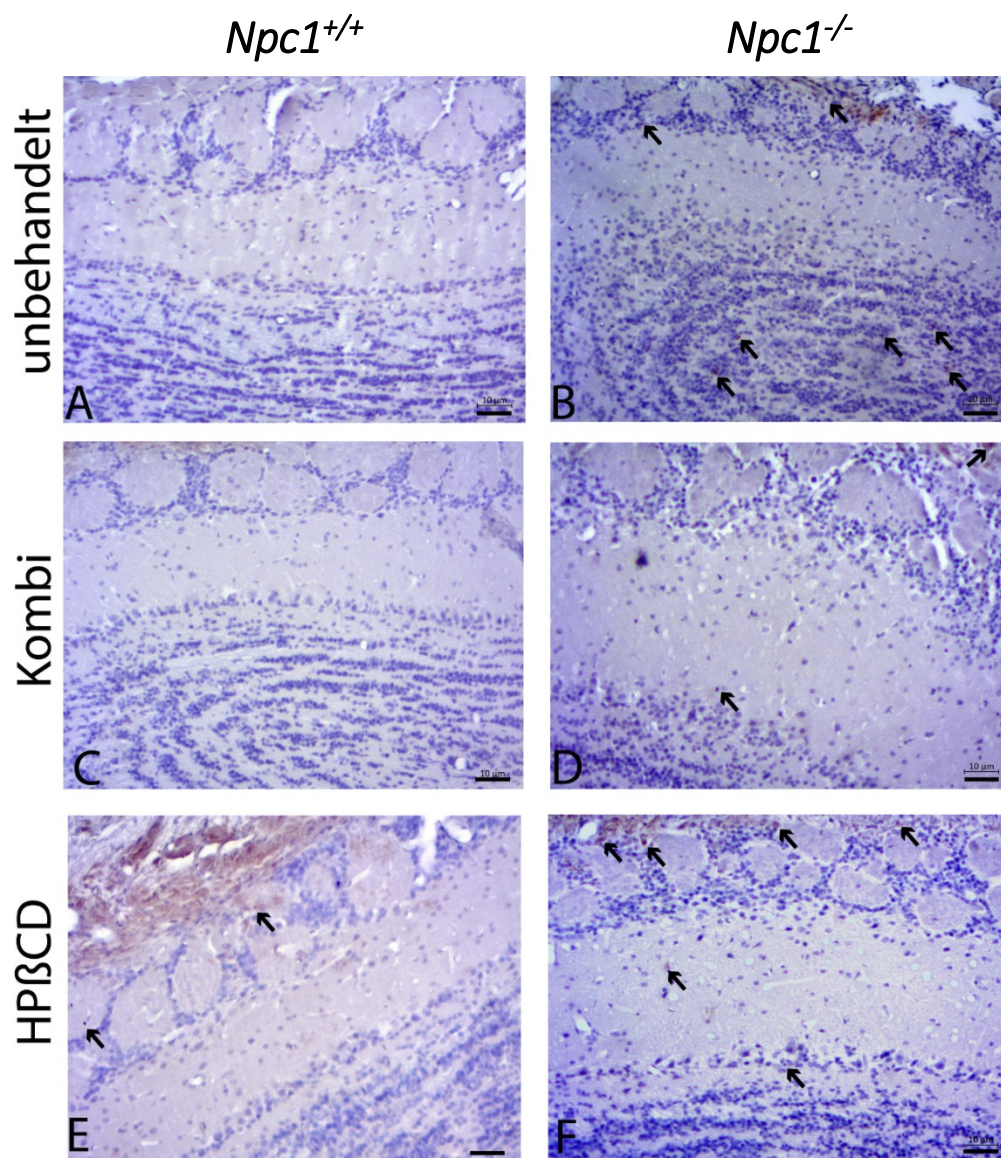


Abbildung 29 Immunhistochemischer Nachweis Cas-3(+) apoptotischer Zellen im OB. Sowohl die unbehandelten (A) als auch die behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (C, E) zeigen nur gelegentlich apoptotische Zellen (Pfeil). Im Gegensatz dazu demonstrieren die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse (B)

eine deutlich gesteigerte Immunreaktivität gegen Cas-3 überwiegend im Bereich der GCL. Im Vergleich dazu zeigen die Kombi-behandelten **(D)** und HPßCD-behandelten **(F)** *Npc1^{-/-}* Mäuse eine Reduktion der Apoptoseaktivität. Die lichtmikroskopische Auswertung zeigt keine erkennbaren Veränderungen der Cas-3 Reaktivität in den Kombi- **(C)** oder HPßCD-behandelten **(E)** *Npc1^{+/+}* Mäusen. Eine erhöhte Apoptoseaktivität nach der HPßCD-Behandlung kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. (Skalierungsbalken entspricht 10 µm.)

Cas-3(+) Zellen treten nur sehr selten im OB der unbehandelten *Npc1^{+/+}* Mäuse auf (Abbildung 29A). Im Gegensatz dazu zeigen die unbehandelten *Npc1^{-/-}* zahlreiche apoptotische Zellen, die überwiegend in der GCL zu finden sind (Abbildung 29B). Sowohl die Kombi- als auch die HPßCD-Behandlung reduzieren die Apoptoseaktivität in den *Npc1^{-/-}* Mäusen sichtbar, zeigen aber weiterhin Cas-3(+) Zellen in der MCL und GL (Abbildung 29D, F), wobei die Kombi-Behandlung möglicherweise einen größeren Effekt hat als die HPßCD-Behandlung. In den behandelten *Npc1^{+/+}* Mäusen kann lichtmikroskopisch ein therapieinduzierter Effekt auf die Apoptoseaktivität zwar nicht eindeutig beobachtet, jedoch auch nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 29C, E).

4.3. Ergebnisse der Riechtests

Für die Beurteilung der Riechleistung wurde ein Riechtest in Form eines Buried Pellet und eines Surface Pellet Tests von allen sechs Behandlungsgruppen durchgeführt. Ziel dieser Tests ist es, ein im Streu vergrabenes Futterstück innerhalb von 5 min zu finden (Buried Pellet Test). Der im Anschluss durchgeführte Surface Pellet Test soll Beeinträchtigungen der Motorik oder der Motivation zur Futtersuche ausschließen. Die Ergebnisse beider Tests sind als Mittelwert \pm SEM in Tabelle 5 zusammengefasst. Die graphische Darstellung erfolgt in Form eines Box-Plot-Diagramms, um die Streuung der Messergebnisse besser darstellen zu können (Abbildung 30, Abbildung 32). Dieses repräsentiert den Median, das Minimum und Maximum der Messungen sowie die Quartile und Ausreißer (Stern, Kreis).

Um mögliche Beeinträchtigungen der Behandlungen auch in den unbehandelten *Npc1^{+/+}* und *Npc1^{-/-}* Mäusen auszuschließen, wurde diesen nach dem gleichen Behandlungsschema (Abbildung 10) das entsprechende Lösungsmittel injiziert. Diese Tiere werden nachfolgend als „sham-behandelt“ bezeichnet.

4.3.1. Ergebnisse des Buried Pellet Tests

Für das Auffinden eines im Streu vergrabenen Futterstücks benötigen die sham-behandelten *Npc1^{+/+}* Mäuse durchschnittlich 53 ± 12 s (Abbildung 30). Alle sham-behandelten *Npc1^{+/+}* Mäuse beendeten den Buried Pellet Test erfolgreich, wobei 95 % weniger als 2 min für das Auffinden benötigten (Abbildung 31).

Im Gegensatz dazu brauchen die sham-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse signifikant länger mit einer nahezu 3-fach höheren Latenzzeit von 145 ± 27 s ($p = 0,003$). Weiterhin finden nur noch 56 % der sham-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse das Futterstück innerhalb der ersten Minute, während bei 25 % der Test nach 5 min erfolglos abgebrochen werden musste (Abbildung 31).

Der deutliche Anstieg der Latenzzeit in den sham-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen kann durch die Kombi-Behandlung mit Miglustat, Allopregnanolon und HP β CD signifikant um 56 % (81 s) auf 64 ± 12 s reduziert werden ($p = 0,028$). Weiterhin beendeten alle Kombi-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse den Test erfolgreich und 93 % wieder innerhalb der ersten 2 min. Dennoch benötigen die Kombi-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse weiterhin 20 % mehr Zeit als die sham-behandelten Kontrollen, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,331$).

Ähnlich sieht es bei den HP β CD-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen aus. Diese benötigen durchschnittlich 48 ± 8 s und alle beendeten den Test innerhalb der ersten 2 min. Im direkten Vergleich reduziert die Behandlung mit HP β CD die Latenz signifikant um 68 % (98 s; $p = 0,007$) zu den sham-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen und, ohne statistische Relevanz, um 11 % im Vergleich zu den sham-behandelten *Npc1^{+/+}* Mäusen ($p = 0,898$).

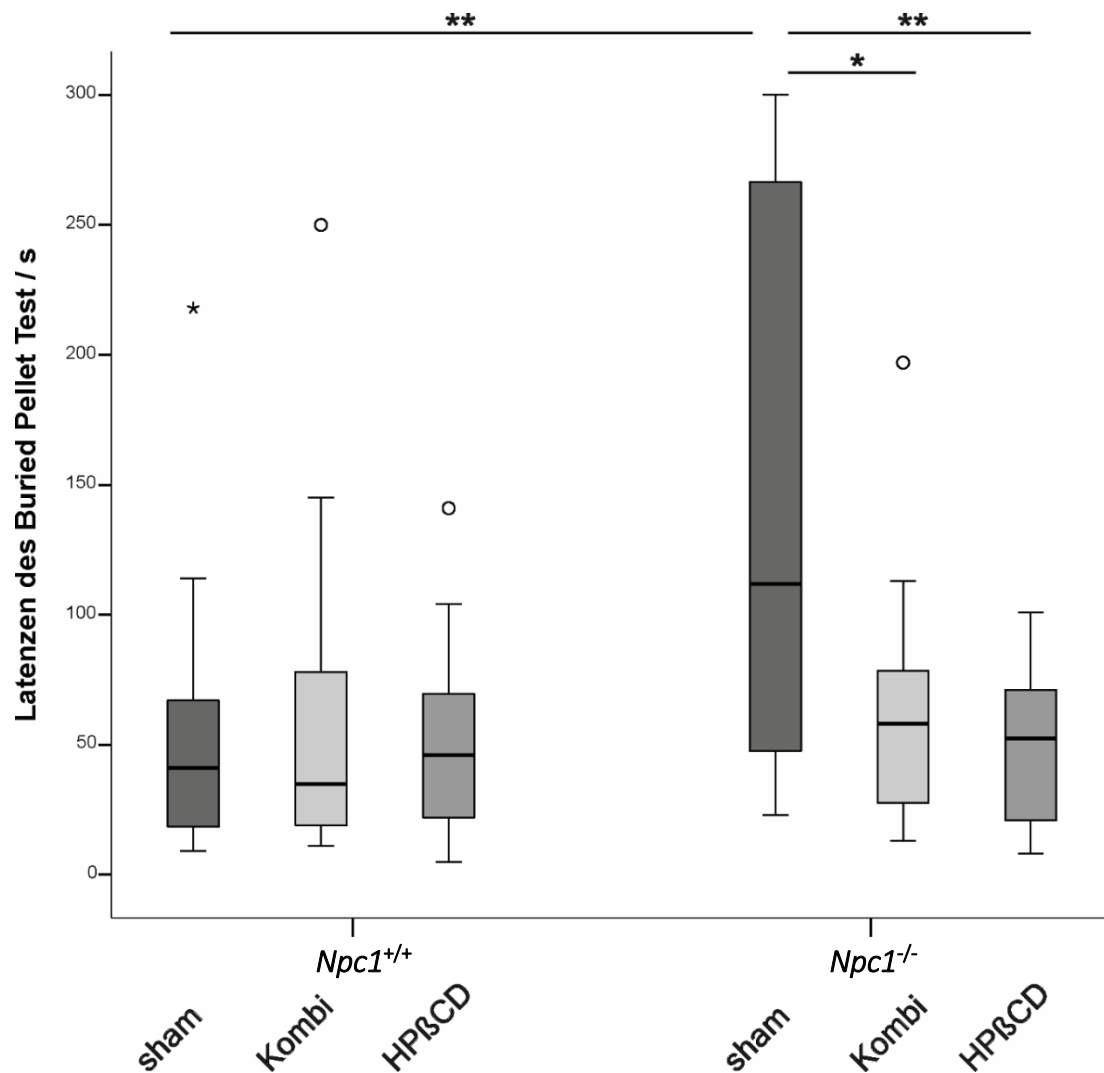


Abbildung 30 Ergebnisse der Buried Pellet Test. Die sham-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse riechen im Durchschnitt mit einer nahezu 3-fach erhöhten Latenzzeit signifikant schlechter als die sham-behandelten Kontrollen. Die gestörte Riechfunktion der *Npc1*^{-/-} Mäuse kann aber sowohl durch die Kombi- als auch durch die HPβCD-Behandlung wieder auf das Niveau der Kontrollen normalisiert werden. Bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen kann kein therapieassoziiierter Effekt auf die olfaktorische Leistung festgestellt werden. Alle Ergebnisse sind in Form eines Box-Plot Diagramms dargestellt, welches den Median, Minimum und Maximum, die Quartile und Ausreißer (Stern, Kreis) beschreibt. *p*-Werte < 0,05 werden als signifikant gewertet (* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01).

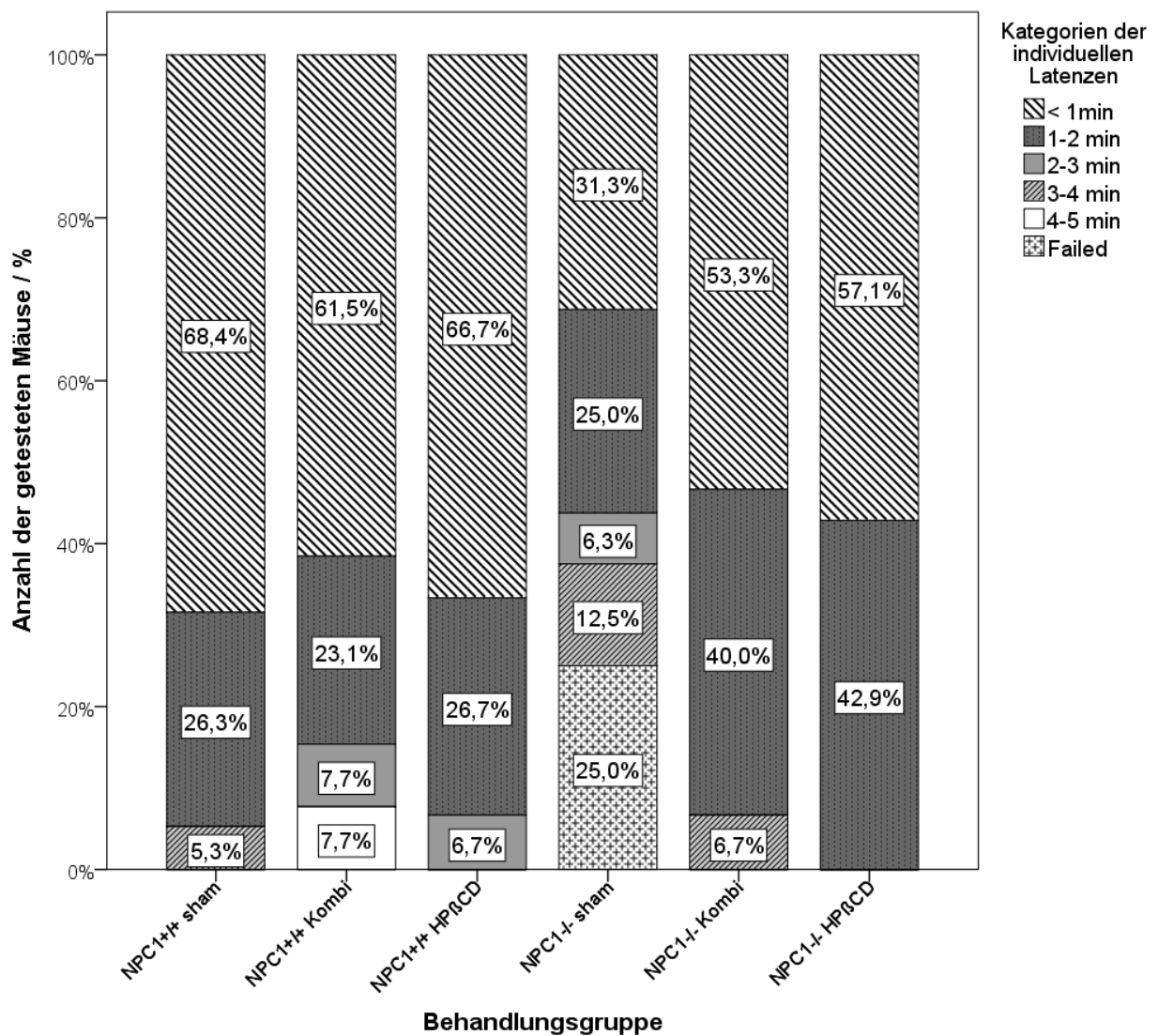


Abbildung 31 Kategorisierung der Latenzen des Buried Pellet Test. Die Ergebnisse des Buried Pellet Tests zeigen ein weites Spektrum unterschiedlicher Latenzen. Während 95% der sham-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse das vergrabene Futterstück innerhalb von 2 min fanden, schafften dieses nur 56% der sham-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse, wobei bei 25% dieser Gruppe den Test nicht erfolgreich beendeten. Nach der Behandlung konnten wiederum 93% der Kombi-behandelten und sogar 100% der HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse den Test innerhalb von 2 min. Bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Kontrollen konnte kein nennenswerter Unterschied in der Riechleistung detektiert werden. (Die Zahl in den Kästchen repräsentiert die prozentuale Anzahl der Mäuse, die den Test innerhalb der Zeitspanne beendeten.)

Die beiden Behandlungsformen zeigen keine relevanten Effekte auf die Riechleistung bei den *Npc1*^{+/+} Mäusen. Kombi-behandelte *Npc1*^{+/+} Mäuse benötigen durchschnittlich 63 ± 19 s zum Auffinden des vergrabenen Futterstücks, 85 % davon beendeten den Test innerhalb der ersten 2 min und bei keiner musste der Test erfolglos abgebrochen werden. Im Vergleich zu den sham-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen benötigen die Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse 19 % (10 s) länger, aber ohne statistische Signifikanz ($p = 0,803$). HPβCD-behandelte *Npc1*^{+/+} Mäuse zeigen ähnliche Ergebnisse mit einer Latenz von 50 ± 10 s, wobei alle getesteten Mäuse den Test erfolgreich beendeten und 73 % innerhalb der ersten 2 min.

Auch hier sind die HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse minimal um 7 % (4 s) schneller ohne statistische Relevanz ($p = 0,972$).

Beim Vergleich beider Behandlungen untereinander zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede. So können beide Behandlungen die Riechleistung der *Npc1*^{-/-} Mäuse nahezu normalisieren ohne einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungsformen ($p = 0,395$). Auch bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen zeigt sich kein relevanter Unterschied zwischen den Behandlungen ($p = 0,730$).

4.3.2. Ergebnisse des Surface Pellet Tests

Um motorische Störungen oder eine veränderte Motivation bei der Futtersuche der hungrigen Mäuse auszuschließen, wurden alle Tiere ein zweites Mal einem Surface Pellet Test unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 und Tabelle 5 zusammengefasst.

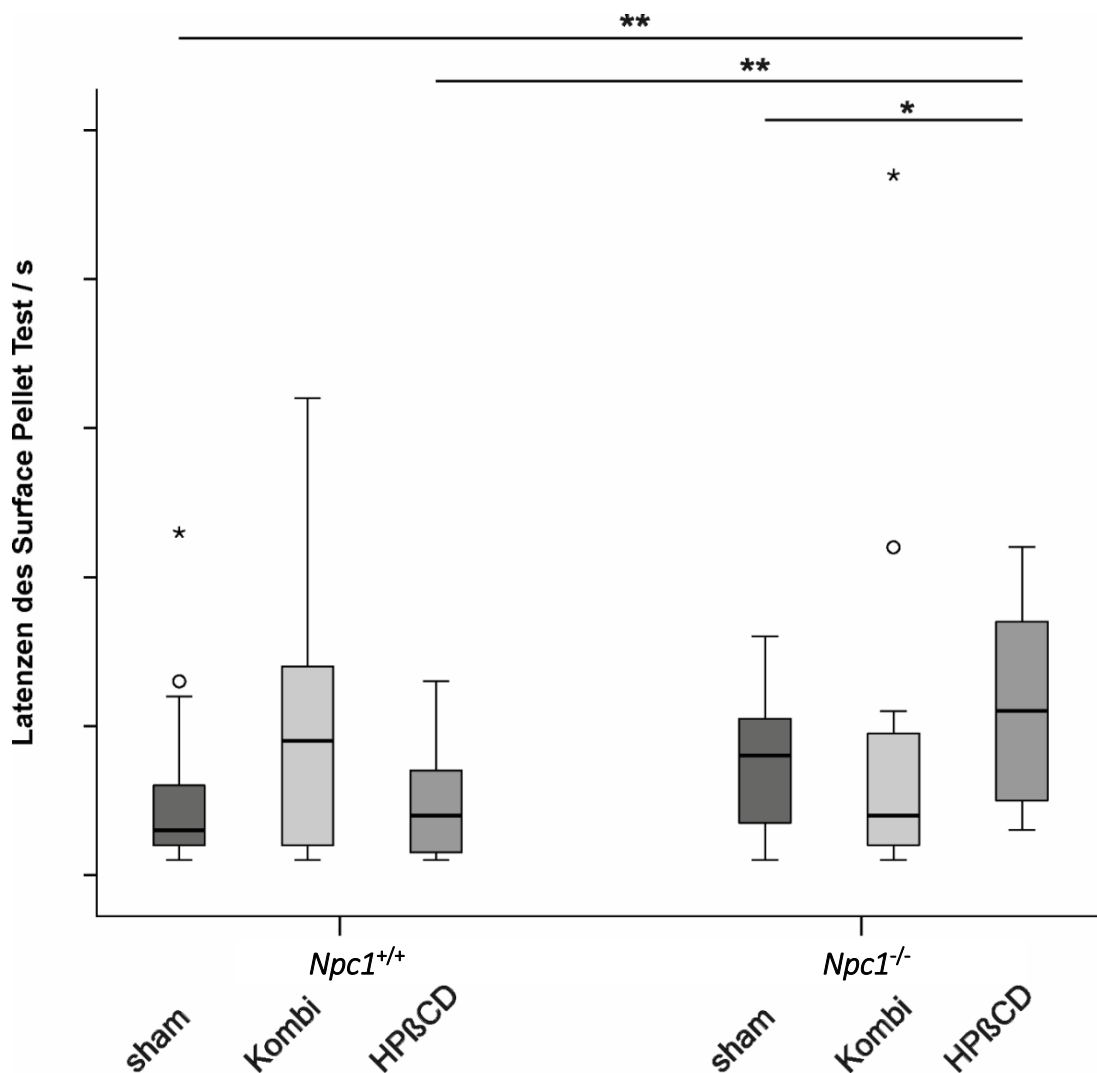


Abbildung 32 Ergebnisse des Surface Pellet Test. Alle getesteten Mäuse fanden das auf der Streuoberfläche befindliche Futterstück innerhalb von weniger als 1 Minute, unabhängig vom Genotyp oder der Behandlung. Die Latenzen variieren hierbei von 1 s bis zu maximal 47 s. Eine Beeinträchtigung der getesteten Mäuse in ihren motorischen Fähigkeiten und in der Motivation zur Futtersuche kann ausgeschlossen werden. Alle Ergebnisse sind in Form eines Box-Plot Diagramms dargestellt, welches den Median, Minimum und Maximum, die Quartile und Ausreißer (Stern, Kreis) beschreibt. p -Werte $< 0,05$ werden als signifikant gewertet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Alle getesteten Mäuse fanden das Futterstück in weniger als 1 min, unabhängig von ihrem Genotyp oder dem Behandlungshintergrund. Die Latenzen variieren zwischen minimal 1 s bis maximal 47 s und die Mittelwerte bewegen sich zwischen 4,93 s (HPßCD-behandelte *Npc1^{+/+}*) und 11,23 s (Kombi-behandelte *Npc1^{+/+}*). Da die ermittelten Zeiten des Surface Pellet Tests sehr gering sind, kann angenommen werden, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen ausschließlich die Streuung der Messergebnisse widerspiegeln und Beeinträchtigungen in der Motorik oder Motivation der getesteten Mäuse auszuschließen sind.

Behandlungsgruppe (Stichprobengröße)	Latenz Buried Pellet Test (t/s \pm SEM)	Latenz Surface Pellet Test (t/s \pm SEM)
Sham-behandelte <i>Npc1^{+/+}</i> (19)	53,32 \pm 11,66	5,16 \pm 1,29
Sham-behandelte <i>Npc1^{-/-}</i> (16)	145,25 \pm 27,11	7,50 \pm 1,13
Kombi-behandelte <i>Npc1^{+/+}</i> (13)	63,23 \pm 18,83	11,23 \pm 2,847
Kombi-behandelte <i>Npc1^{-/-}</i> (15)	64,27 \pm 12,42	8,53 \pm 3,11
HPßCD-behandelte <i>Npc1^{+/+}</i> (15)	49,53 \pm 9,86	4,93 \pm 1,01
HPßCD-behandelten <i>Npc1^{-/-}</i> (14)	47,57 \pm 7,88	11,07 \pm 1,802

Tabelle 5 Zusammenfassung der Latenzen des Buried und Surface Pellet Tests. Die sham-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse benötigen im Buried Pellet Test im Durchschnitt fast die 3fache Zeit als die sham-behandelten Kontrollen, während sich die behandelten *Npc1^{-/-}* und *Npc1^{+/+}* Mäuse kaum noch voneinander unterscheiden. Der Surface Pellet Test zeigt hingegen keine nenneswerten Auffälligkeiten. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5. Diskussion

Das olfaktorische System ist bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Meshulam et al. 1998; Djordjevic et al. 2008; Arnold et al. 2010; Attems und Jellinger 2006; Devanand et al. 2015), Morbus Parkinson (Hawkes et al. 1997; Ross et al. 2008; Doty 2012; Berendse et al. 2001; Hummel et al. 2010) oder Morbus Huntington (Moberg et al. 1987; Lazic et al. 2007; Barrios et al. 2007) beeinträchtigt. Obwohl diese Riechstörungen bereits im frühen Verlauf der Erkrankungen auftreten, wurde bisher wenig über den Einfluss von Neurodegeneration und –regeneration im olfaktorischen System berichtet. Dabei stellt gerade diese Region eine direkte Verbindung von peripherem und zentralen Nervensystem dar. Die exponierte Lage der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) im Riechepithel (OE), der direkte Zugang zum Bulbus olfactorius (OB) sowie die Fähigkeit dieses Systems, Neurone lebenslang ersetzen zu können, machen das Riechsystem möglicherweise zum Startpunkt der fortschreitenden Neuropathologie, aber auch zu einem vielversprechenden diagnostischen Tool (Huard et al. 1998).

In dieser Arbeit wurde insbesondere die Regenerationsfähigkeit des olfaktorischen Systems in einem NPC1 Mausmodell analysiert und der Einfluss zweier Behandlungsstrategien auf das immunhistochemische Profil untersucht. Dafür wurde eine synergistisch wirkende Kombinationstherapie (Kombi) aus Miglustat, 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) und Allopregnanolon sowie eine Monotherapie mit HP β CD allein angewendet. Die dafür angefertigten Paraffinserienschnitte wurden auf verschiedene immunhistochemische Marker untersucht. Für die Beurteilung der Homöostase von Zellneubildung und Zelltod wurden die BrdU(+) proliferierenden und die Cas-3(+) apoptotischen Zellen sowohl im OE als auch im OB von behandelten und unbehandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen analysiert. Darüber hinaus wurden der Einfluss des Genotyps und der beiden Behandlungsstrategien auf die neuronale Struktur untersucht. Hierfür wurde die Anzahl der OMP(+) reifen ORN im OE bzw. der TH(+) dopaminergen Neurone im OB bestimmt. Im OE wurden ergänzend die lysosomale Aktivität mit CathD, die GAP45(+) unreifen ORN sowie die Iba1(+) Mikro- und GFAP(+) Makroglia im OB der sechs Behandlungsgruppen beurteilt. Um den Einfluss der Veränderungen auf zellulärer Ebene auch funktionell klären zu können, wurde abschließend die Riechfähigkeit von Kombi- bzw. HP β CD-behandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen mit einem Buried Pellet Verhaltenstest untersucht und die Latenzen zum Auffinden eines im Streu vergrabenen Futterstücks mit denen der sham-behandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen verglichen, welche lediglich mit Ringer- bzw. physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurden.

5.1. Der Normalzustand in den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Kontrollmäusen

Die Analyse der BrdU(+) proliferierenden und Cas-3(+) apoptotischen Zellen zeigt positive Zellen in nahezu allen Bereichen des OE und des OB und spiegelt die Homöostase von Zellneubildung und Apoptose im Riechsystem der gesunden adulten *Npc1*^{+/+} Mäuse wider. Im OE ist dabei ersichtlich, dass OMP(+) reife ORN den Großteil der Zellen ausmachen. CathD war hier weder bei den unbehandelten noch bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen nachweisbar.

Kawagishi et al. (2014b) entwickelten eine Methode zur stereologischen Quantifizierung reifer ORN in einem C57BL/6J Maus-Modell und ermittelten erstmals eine absolute Zellzahl der reifen ORN im unilateralen OE mit $5.140.000 \pm 380.000$ OMP(+) Zellen in männlichen sowie $5.210.000 \pm 380.000$ in weiblichen Mäusen, ohne signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede. In Anlehnung an diese Methode wurden in dieser Arbeit sowohl die OMP(+) ORN als auch die Cas-3(+) apoptotischen Zellen des unilateralen OE von *Npc1*^{+/+} Mäusen in Abhängigkeit der NPC1-Erkrankung sowie der beiden Therapieformen, Kombi- und HPßCD-Behandlung, auf diese Zellen untersucht. Die Zahl der reifen ORN im OE gesunder *Npc1*^{+/+} Mäuse in der vorliegenden Studie ist dabei mit $4.676.983 \pm 184.344$ vergleichbar mit der ursprünglichen Methode von Kawagishi et al. und demnach eine realistische Basis für vergleichende Quantifizierungen.

Neben zahlreichen BrdU(+) proliferierenden und nur sehr vereinzelt auftretenden apoptotischen Zellen im OB der *Npc1*^{+/+} Mäuse, zeigen die gesunden Kontrollmäuse eine starke Immunreaktivität für TH, einem Marker der dopaminergen Interneurone. Im Gegensatz zu den pränatal gebildeten Projektionsneuronen können diese Interneurone auch postnatal gebildet werden (Winner et al. 2002; Altman 1969). Neben der für das Nervensystem ebenfalls bedeutsamen GFAP(+) Astroglia konnte bei den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen keine Iba1(+) Mikroglia-Immunreaktivität nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Riechleistung in Form eines Buried Pellet Tests konnten alle sham-behandelten *Npc1*^{+/+} Kontrollen das im Streu vergrabene Futterstück innerhalb der vorgegebenen Zeit von 5min auffinden. Im Durchschnitt konnten sie den Test mit 53 ± 12 s erfolgreich beenden und bestätigen damit Seo et al. (2014), die eine durchschnittliche Latenz von 55 ± 6 s ermittelten. Eine olfaktorische Beeinträchtigung der Kontrollmäuse kann folglich ausgeschlossen werden.

Beim Vergleich des Regenerationsverhaltens von der Peripherie und des zentralen Nervensystems der gesunden Kontrollen zeigt sich, dass die Dichte der proliferierenden Zellen im OB mehr als das Vierfache der Proliferationsdichte des OE beträgt. Dieses Ergebnis steht damit im Widerspruch zu der Annahme, dass sich das OE aufgrund der kurzen Lebensspanne der exponiert liegenden ORN schneller regenerieren muss und der geschützter liegende OB aufgrund des geringeren Zellumsatzes eine trägere Proliferationsrate aufweist.

Die Angaben zur durchschnittlichen Lebensdauer reifer ORN variieren von ca. 30 Tagen bis hin zu 3 Monaten (Moulton 1974; Graziadei und Graziadei 1979; Mackay-Sim und Kittel 1991). Neueste Untersuchungen zeigen aber, dass 7,8% der perinatal markierten olfaktorischen Sinneszellen (OSN) auch nach 12 Monaten noch nachweisbar sind (Holl 2018). Eine ähnliche Lebenserwartung gilt für die Körnerzellen im OB von Mäusen. Trotz einer Halbwertszeit von 15 bis 45 Tagen, kann ein Drittel der Neurone auch nach einem Jahr noch nachgewiesen werden (Petreanu und Alvarez-Buylla 2002). Bislang ist nicht abschließend geklärt, wie und warum die adulte Neurogenese im OB reguliert wird. Der neuronale Ersatz ist vermutlich aber nicht nur eine Kompensation absterbender Zellen, sondern auch eine notwendige Dynamik des zentralen Nervensystems, sich an die stetig ändernden Signale der Umwelt anzupassen und die Unterscheidung verschiedener Gerüche zu erlernen (Lledo und Valley 2016).

5.2. Schwere neurodegenerative Veränderungen bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen

Vorab konnte bereits eine sichtbare Reduktion der axonalen Verknüpfungen der OMP(+) ORN in Richtung OB nachgewiesen werden (Hovakimyan et al. 2013b). Mit dieser Studie wurde erstmals das genaue Ausmaß der Neurodegeneration im OE und OB von 8 Wochen alten *Npc1*^{-/-} Mäusen nachgewiesen (Meyer et al. 2017; Meyer et al. 2018).

Die Analyse des immunhistochemischen Profils des OE der adulten, unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigt eine drastische Reduktion der reifen OMP(+) ORN. Dabei ist die Rolle dieser Neurone von essentieller Bedeutung für den Riechprozess. Als primäre Sinneszellen der Riechbahn besitzen die bipolaren Neurone auf der zur Epitheloberfläche gerichteten, apikalen Seite einen mit Zilien besetzten dendritischen Knopf, der die Geruchsstoffe über spezifische olfaktorische Rezeptoren bindet. Auf der basalen Seite werden diese Informationen dann über Axone zum OB weitergeleitet, wo sie Synapsen mit den Interneuronen bilden (Mombaerts 2006). In den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen ist die Anzahl der OMP(+) ORN im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen auf 41% reduziert, welches folglich auch eine Reduktion des axonalen Inputs bedingt.

Ergänzend konnte eine signifikant auf das 2,5fache erhöhte Apoptoserate im OE der unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse detektiert werden, welche den dramatischen neuronalen Verlust verdeutlicht. Seo et al. bestätigen diese Ergebnisse und konnten darüber hinaus auch einen reduzierten Pool der unreifen, GAP43(+) ORN in den *Npc1*^{-/-} Mäusen nachweisen (Seo et al. 2014). Auch unsere lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Reaktion gegen GAP43 lassen auf diesen Effekt schließen.

Weiterhin kann eine deutliche Steigerung der CathD(+) lysosomalen Aktivität festgestellt werden. Diese Beobachtung bestätigt vorherige eigene Studien, in denen sowohl CathD als auch Galectin-3, ein Makrophagen-typisches, Kohlenhydrat-bindendes Protein, nachweislich in *Npc1*^{-/-} Mäusen erhöht ist (Hovakimyan et al. 2013b; Cluzeau et al.

2012; Liu et al. 1995). Erhöhte CathD-Werte stehen darüber hinaus auch im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Gaucher oder lysosomalen Speichererkrankungen und treten mitunter bereits vor den typischen Krankheitssymptomen auf (Cataldo et al. 1991; Callahan et al. 1999; Ginsberg et al. 2000; Vitner et al. 2010). Ähnliche Effekte konnten auch im Hirnstamm, Cerebellum, Hippocampus und der Leber bei NPC1 gezeigt werden (Liao et al. 2007; Cluzeau et al. 2012; Amritraj et al. 2013).

Die qualitative und quantitative, lichtmikroskopische Auswertung der BrdU(+) Zellen zeigt allerdings 45% mehr neu gebildete Zellen als die unbehandelten *Npc1^{+/-}* Mäuse sowohl im Bereich der Basalzellen, der ORN und der Stützzellen und somit in allen Schichten des OE. Dies zeigt, dass die mitotisch aktiven Basalzellen sich bereits zu ORN ausdifferenziert haben und die Proliferation auch die sich selbst erneuernden Stützzellen betrifft. Während die unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse zahlreiche absterbende Neurone kompensieren müssen, ist die Zellerneuerung in den *Npc1^{+/-}* Mäusen deutlich reduzierter. Dennoch kann die gesteigerte Proliferationsaktivität der epithelialen Basalzellen den neuronalen Verlust im OE der *Npc1^{-/-}* Mäuse nicht vollständig ausgleichen.

Der massive Verlust von ORN im OE der unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse führte zu der Annahme, dass auch die TH(+) dopaminergen periglomerulären Neurone (PG) des OB, entweder als Ursache oder als Folge, durch den gestörten sensorischen Input in den kranken Tieren verändert sein könnten. Verschiedene Studien zeigten eine Reduktion der TH(+) PG nach sensorischer Deprivation oder Läsion des OE (Nadi et al. 1981; Stone et al. 1990; Baker et al. 1993; Cho et al. 1996). Seo et al. (2014) beobachteten eine um die Hälfte reduzierte TH(+) Immunreaktivität im *Npc1^{-/-}* OB. Unsere Western Blot Untersuchungen zeigen ebenfalls eine Reduktion des TH-Proteins in *Npc1^{-/-}* Mäusen und bestätigen die Ergebnisse von Seo et al. (Meyer et al. 2018). Dennoch zeigen die quantitativen Analysen der TH(+) Zellen dieser Studie keine Veränderungen in der Anzahl der TH(+) PG im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollmäusen. Die lichtmikroskopische, qualitative Auswertung lässt jedoch eine verminderte TH-Immunreaktivität im Bereich der Glomeruli und somit eine Reduktion der TH(+) Nervenfasern vermuten. Da Seo et al. das gesamte TH(+) Fluoreszenzsignal detektierte anstatt der tatsächlichen Anzahl der dopaminergen Zellen, ist die Halbierung des TH(+) Signals wahrscheinlich auf den Dopamin-Verlust bzw. den Verlust der dopaminergen Axone und Dendriten, nicht aber der Neurone an sich zurückzuführen.

Trotz der unveränderten Anzahl der periglomerulären Zellen konnte sowohl eine gesteigerte Proliferation als auch Apoptose im OB der unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse nachgewiesen werden. Auch Untersuchungen des Proliferationsmarker Ki67 mittels quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR) zeigen eine Erhöhung der absoluten Ki67 Expression im OB der *Npc1^{-/-}* Mäuse im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Meyer et al. 2018). Die erhöhte Zellneubildung kann durch die schwere Astrogliose und Mikrogliose erklärt werden. Seo et al. (2014) konnten ebenso eine aktivierte Neurogenese in 8 Wochen alten *Npc1^{-/-}* Mäusen aufzeigen sowie eine Co-Lokalisation von BrdU und Iba1 in 36% der neu gebildeten Zellen. Die nachweislich 3fach erhöhte Mikrogliose steht zwar aufgrund der

deutlich gesteigerten Apoptoseaktivität und einer gehemmten neuronalen Ausdifferenzierung im direkten Zusammenhang mit der fortschreitenden olfaktorischen Beeinträchtigung, die Schlüsselrolle in der Degeneration der ORN spielt stattdessen aber die unzureichende axonale Verknüpfung von ORN und OB.

Die Rolle von Glia-Zellen in neurodegenerativen Prozessen ist umstritten. Obwohl immer mehr Studien Glianarben als Resultat des neuronalen Zelltods erklären (Baudry et al. 2003; Suzuki et al. 2003; Chen et al. 2007), kann dieser Effekt auch genauso die Ursache der Neuropathologie darstellen (Seo et al. 2014; Seo et al. 2016; German et al. 2002).

5.3. Reduzierte Riechleistung im Buried Pellet Verhaltenstest bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen

Neben dem immunhistochemischen Profil wurde auch die Riechfähigkeit der *Npc1*^{-/-} Mäuse in einem Buried Pellet Test untersucht. Die sham-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigten eine deutlich schlechtere Riechleistung als die gesunden Kontrolltiere und benötigten im Durchschnitt nahezu die dreifache Zeit, ein im Streu vergrabenes Futterstück zu finden. Die Auswertung aber eine große Variabilität innerhalb der Gruppe. Während 25% der getesteten sham-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse das Futterstück nicht innerhalb der vorgegebenen Zeit von 5 min fanden, waren 31% genauso schnell wie der Durchschnitt der sham-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse. Im ergänzenden Surface Pellet Test hatten weder die *Npc1*^{+/+} noch die *Npc1*^{-/-} Mäuse Schwierigkeiten, ein sichtbares, auf dem Streu befindliches Futterstück zu finden. Folglich können motorische Einschränkungen oder Veränderungen in der Motivation zur Futtersuche bei allen getesteten Tieren ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse bestätigen andere Untersuchungen im gleichen Tiermodell (Seo et al. 2014).

Weiterhin deuten auch frühere Untersuchungen der elektrischen Potenziale des OE in Form eines Elektroolfaktogramms nach einer Stimulation mit PEA, H₂S und CO₂ auf tendenziell verminderte Amplituden eine somit beeinträchtigte olfaktorische Funktion in 9 Wochen alten *Npc1*^{-/-} Mäusen (Hovakimyan et al. 2013b).

Diese Ergebnisse zeigen die Komplexität des Riechsystems und die Fähigkeit dieses, schwere morphologische Schäden durch konstante Zellerneuerung zu kompensieren.

5.4. Die Kombinations-Behandlung reduziert neuropathologische Prozesse und verbessert die Riechfähigkeit bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen

Bislang verläuft die NPC1-Erkrankung tödlich. Miglustat ist für NPC1-Patienten aktuell das einzige zugelassene Medikament in Europa, Kanada und Japan (Platt und Jeyakumar 2008). Mehrere Studien im NPC1 Mausmodell belegen einen synergistischen Effekt bei der Kombination von Miglustat, HPßCD und Allopregnanolon (Davidson et al. 2009; Meyer et al.

2017; Meyer et al. 2018; Witt et al. 2018; Hovakimyan et al. 2013a; Maass et al. 2015). Die Medikamente greifen in den lysosomalen Cholesterin-Haushalt ein, der aufgrund des veränderten NPC1-Proteins beeinträchtigt ist. So konnte eine signifikante Reduktion der Glykosphingolipid-Akkumulationen, ein verzögerter Beginn der klinischen Symptome, eine 30% längere Lebenserwartung, der Erhalt der cerebellären Purkinje-Zellen, eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten sowie der Rückgang von Einschlüssen in der Cornea nachgewiesen werden (Maass et al. 2015; Davidson et al. 2009; Hovakimyan et al. 2011; Hovakimyan et al. 2013a).

Auch diese Studie bestätigt die positiven Auswirkungen der Kombi-Behandlung auf die *Npc1*^{-/-} Mäuse. Eine phänotypische Unterscheidung zwischen gesunden *Npc1*^{+/+} Mäusen und den behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen ist aufgrund der normalisierten motorischen Fähigkeiten und des ausbleibenden starken Gewichtsverlusts nicht mehr möglich. In Bezug auf die Zelldynamik des Neuroepithels zeigen die vorliegenden Daten nach einer 7-wöchigen Kombi-Behandlung eine Verdopplung der reifen ORN sowie eine signifikante Reduktion der apoptotischen Prozesse um fast die Hälfte im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen. Auch die Proliferation ist um 78% signifikant erhöht. Dennoch kann die Behandlung die Neuropathologie nicht komplett aufhalten. Die erhöhten CathD- und Cas-3-Aktivitäten lassen auf weiterhin anhaltende neurodegenerative Prozesse schließen.

Auch im OB zeigt die Kombi-Behandlung eine sichtbare Reduktion der Mikro- und Makroglia sowie der Apoptoseaktivität in den *Npc1*^{-/-} Mäusen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Neuroepithels bewirkt die Kombi-Behandlung keine Verdopplung der Proliferationsaktivität, sondern reduziert im OB die pathologisch gesteigerte Zellerneuerung nahezu auf das Niveau der gesunden Kontrollen.

Stattdessen ist die Ki67-Expression in den Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen signifikant um das 13fache erhöht (Meyer et al. 2018). Ki67 ist ein intranukleäres Protein, welches in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird mit Ausnahme der G0-Phase ruhender Zellen (Scholzen und Gerdes 2000). Da BrdU als Thymidin-Analogon nur während der S-Phase in die DNA eingebaut wird, werden folglich keine Zellen detektiert, die sich in der G1-Phase befinden (Ohta und Ichimura 2000). Zwar zeigt der Vergleich der Ki67- und der BrdU-Aktivität im OE auch bei den anderen Gruppen leichte Unterschiede, aber immer mit einem proliferationssteigernden Ergebnis. Lediglich der OB der Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigt diese widersprüchlichen Ergebnisse in der Quantifizierung der BrdU(+) und Ki67(+) Immunreaktivität (Meyer et al. 2018).

Unabhängig von den Ergebnissen der Proliferationsaktivität ist im OB eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der Anzahl der TH(+) Interneurone nachweisbar, die wahrscheinlich mit der Diversität der Proben und der Streuung der Ergebnisse zu erklären ist. Ein therapeutischer Effekt auf die Anzahl der dopaminergen Interneurone kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Auch der Buried Pellet Test zeigt den deutlichen Erfolg der Behandlung. Zwar benötigen die Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse durchschnittlich 20% länger beim Auffinden der im Streu vergrabenen Zerealie als die Kontrollen, aber im Gegensatz zu den sham-behandelten

Npc1^{-/-} Mäusen konnten alle Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse den Riechtest erfolgreich beenden.

5.5. Die HPβCD-Behandlung normalisiert die Riechleistung und reduziert die Neuropathologie im OE bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen

HPβCD wurde ursprünglich nur als Vehikel für das schwer lösliche Allopregnanolon verwendet (Griffin 2004). Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass der therapeutische Nutzen dieser Behandlung eher auf das HPβCD und weniger auf das Allopregnanolon zurückzuführen ist (Davidson et al. 2009; Liu et al. 2009). Nachdem auch synergistische Effekte wie eine Reduktion des Cholesterols in den Organen und ein verzögerter Beginn der neurologischen Symptome nach ausschließlicher Administration von HPβCD nachgewiesen werden konnten (Liu et al. 2010; Ramirez et al. 2010; Matsuo et al. 2013; Vance und Karten 2014), ist HPβCD auch als potenzielles Arzneimittel für die symptomatische und unterstützende Behandlung von NPC1-Patienten in den Fokus gerückt und wird derzeit in einer groß angelegten randomisierten Studie der FDA untersucht (NCT02534844). Bei *Npc1*^{-/-} Mäusen konnte eine wöchentliche subkutane Injektion von bis zu 4000mg/kg HPβCD die Lebenserwartung erhöhen und die Symptome sowie die Cholesterol-Sequestration der Leber signifikant verbessern (Tanaka et al. 2015). Bei einem Patienten konnte eine Verbesserung des Krankheitszustands durch eine zweifache wöchentliche Behandlung mit 2500 mg/kg HPβCD erreicht werden (Tanaka et al. 2015). Eine anderthalbjährige intrathekale Behandlung mit 200 mg HPβCD führte sogar zu einer Stabilisierung der pathologischen Prozesse eines weiteren Patienten (Maarup et al. 2015). Eine weitere Studie wies in den ersten 6 Monaten nach einer schrittweise ansteigenden HPβCD-Dosis von 80 mg/kg bis 2,5 g/kg positive Effekte in zwei Patienten nach. Zwar konnten keine Veränderungen der neurologischen Defizite festgestellt werden, dennoch reduzierte die Behandlung die Hepatosplenomegalie und Störungen im zentralen Nervensystem (Matsuo et al. 2013).

Die Behandlung mit HPβCD zeigt allerdings auch Nebenwirkungen wie ein nachweisbarer Hörverlust (Crumling et al. 2012; Ward et al. 2010; Vite et al. 2015). Ein toxischer Effekt von HPβCD sollte ausgeschlossen werden, da bei subkutaner Injektion verschiedener HPβCD-Konzentrationen von 1000 mg/kg bis 4000 mg/kg in *Npc1*^{-/-} Mäusen keine Unterschiede in der vermeintlichen Toxizität nachweisbar war (Tanaka et al. 2015). Die höchsten Überlebensraten wurden bei einer Konzentration von 4000 mg/kg erreicht (Tanaka et al. 2015).

Andere zytotoxische Effekte der hohen HPβCD-Konzentration können dennoch nicht ausgeschlossen werden, zumal es an Studien fehlt, die andere Behandlungsfrequenzen und unterschiedliche Verabreichungsformen untersuchen. In der Studie von Megias-Vericat et al. (2017) sind die Nebenwirkungen von HPβCD bei 11 Patienten zusammengestellt. Von

den insgesamt 17 genannten Nebenwirkungen sind 11 auf das Medikament selbst zurückzuführen und 6 auf die Art der Verabreichung. Neben dem Hörverlust bei 4 Patienten sind Fieber und nicht-infektiöse Meningitis die schwerwiegendsten. Dennoch zeigt HPßCD einen stabilisierenden Effekt bei NPC1 und ein geringes toxisches Potenzial.

In der vorliegenden Studie konnte ebenso ein positiver Effekt der HPßCD-Behandlung in den *Npc1*^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Im OE konnte neben der um 180% signifikant erhöhten Proliferationsaktivität im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen eine Steigerung der Anzahl der reifen ORN um 69 % sowie eine um 71% reduzierte Apoptoseaktivität gezeigt werden.

Im OB der HPßCD-behandelten Tiere ist der therapeutische Nutzen etwas limitierter. Zwar kann die Apoptoseaktivität in der lichtmikroskopischen Analyse kaum von den gesunden Kontrollen unterschieden werden und die Astrogliose zeigt eine sichtbare Reduktion, wenngleich keine Normalisierung. Dennoch kann keine Verbesserung der gesteigerten Proliferationsaktivität und Mikrogliose nachgewiesen werden. Mit ca. 9% mehr BrdU(+) Zellen als die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse wirkt HPßCD möglicherweise proliferationssteigernd, wahrscheinlich hat es aber einfach keinen Effekt auf die Zellneubildung im OB, und die Unterschiede spiegeln die Diversität der Proben wider. Ähnlich wie die Kombi-Therapie zeigt sich auch nach der HPßCD-Behandlung eine Erhöhung der Anzahl der TH(+) Zellen. Dieser Effekt ist trotz einer Steigerung von 39% zwar statistisch nicht signifikant, ein therapiebedingter Einfluss auf die Anzahl der dopaminergen Interneurone im OB von *Npc1*^{-/-} Mäusen lässt sich aber nicht vollständig ausschließen.

Ein vergleichbares Ergebnis zeigen *Npc1*^{-/-} Mäuse, die mit dem Entzündungshemmer Cyclosporin A (CsA) behandelt wurden. Nach 4 Wochen Behandlung zeigten die CsA-behandelten Tiere 66% mehr DCX(+) Zellen, ein Marker für neuronale Vorläuferzellen, in der GL sowie eine anderthalbfach erhöhte Anzahl BrdU(+) Körnerzellen (Seo et al. 2014).

Ähnlich wie die Kombi-Behandlung verringert auch die HPßCD-Behandlung die CathD-Reaktivität im OB der *Npc1*^{-/-} Mäuse in der vorliegenden Studie, allerdings kann diese auch weiterhin nicht auf das Normalniveau der Kontrollen reduziert werden. Andere Untersuchungen zeigen aber auch, dass nach einer täglichen HPßCD-Injektion das CathD-Level in der Leber von *Npc1*^{-/-} Mäusen wieder normalisiert werden kann, während Miglustat einen nur geringen Effekt zeigt (Cluzeau et al. 2012).

Bei der Beurteilung der Funktionalität des Riechsystems HPßCD-behandelter *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigt der Buried Pellet Test einen deutlichen therapeutischen Erfolg. Alle getesteten *Npc1*^{-/-} Mäuse konnten das vergrabene Futterstück innerhalb von 2min auffinden und waren damit durchschnittlich sogar minimal schneller als die gesunden Kontrollen. Trotz der Limitierungen auf zellulärer Ebene konnte bei den hungrigen HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen keine Beeinträchtigung der Futtersuche detektiert werden.

5.6. Limitierungen der Therapie bei *Npc1*^{-/-}

Die *Npc1*^{-/-} Mäuse sind nach beiden Behandlungsoptionen phänotypisch nicht mehr von den *Npc1*^{+/+} Kontrollen zu unterscheiden und zeigen sowohl nach der Kombi- als auch nach der HPßCD-Behandlung eine deutliche Verbesserung der Riechfähigkeit. Während die Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse durchschnittlich 20% mehr Zeit zum Auffinden des im Streu vergrabenen Futterstücks benötigten als die Kontrollen, waren die HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse sogar minimal schneller. Dieses Ergebnis zeigt, dass beide Therapien die Riechleistung der 8 Wochen alten *Npc1*^{-/-} Mäuse nahezu normalisieren und die Neuropathologie deutlich reduzieren.

Trotz des deutlichen therapeutischen Nutzens bei dem Buried Pellet Test können möglicherweise auch weiterhin olfaktorische Beeinträchtigungen vorliegen, die mit diesem Test nicht erfasst werden. Während der Buried Pellet Test vorrangig die Motivation zur Futtersuche von hungrigen Mäusen untersucht, ist der Geruchssinn auch im sozialen Bereich oder bei der Diskrimination verschiedener Gerüche von Bedeutung. Um die olfaktorische Funktion präzise beurteilen zu können, empfiehlt sich eine Kombination von Tests, welche verschiedene Aspekte des Riechens analysieren wie die Diskrimination des eigenen Geruchs von dem eines Artgenossen oder der Unterscheidung zwischen neuen und unbekannten Gerüchen (Lehmkuhl et al. 2014).

Dennoch zeigt die immunhistochemische Analyse des OE und OB weiterhin die Limitierungen der beiden Therapien und einen anhaltenden neuronalen Verlust. Da die Medikamente nur mit einer einzigen definierten Konzentration angewendet wurden, kann nicht geklärt werden, ob manche Veränderungen der Zellhomöostase aufgrund nicht ausreichender oder möglicherweise zu hoher Dosierung auftreten. Bisher liegen aber keine Studien vor, die einen toxischen Effekt bei den hier verwendeten Konzentrationen nachweisen.

Im OE zeigt sich, dass trotz der um 78% und sogar 180% in den Kombi- bzw. HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen therapiebedingten Proliferationssteigerung die Anzahl der reifen ORN im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen weiterhin reduziert ist. Auch die GAP43-Immunreaktivität der unreifen ORN kann den Verbleib der zahlreichen neu gebildeten Zellen nicht erklären. Möglicherweise können trotz der gesteigerten Proliferation nicht ausreichend neue Zellen nachgebildet werden, um den drastischen Verlust der ORN zu kompensieren. Wahrscheinlich kann sich aber auch ein Großteil der neu gebildeten Zellen nicht zu reifen ORN ausdifferenzieren, sondern verbleiben entweder in einem anderen, hier nicht erfassten Differenzierungsstadium oder sterben einfach wieder ab (Farbman 1990), wenn sie keine Synapsen mit den Mitralzellen im OB bilden können (Hinds et al. 1984).

Die hier vorliegenden Untersuchungen der Zellapoptose bestätigen eine weiterhin höhere Anzahl Cas-3(+) absterbender Zellen in den behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen als in den gesunden Kontrollen. Weiterhin können die BrdU(+) Zellen auch in andere Zelllinien einfließen wie den nicht-neuronalen Stützzellen oder Zellen mit einem anderen Reifestadium, welches die hier verwendeten Marker nicht detektieren. Die CathD-

Immunreaktivität kann durch beide Therapien nur reduziert, aber nicht gänzlich normalisiert werden.

Auch im OB ist der therapeutische Nutzen limitiert. So konnte hier zwar eine Verbesserung der Zellmorphologie durch beide Therapien nachgewiesen werden, indem sowohl die Kombi- als auch die HPβCD-Behandlung eine antiinflammatorische Wirkung zeigen. Aber auch im OB kann weder die Mikro- bzw- Astrogliaaktivität noch die Apoptose vollständig normalisiert werden. Im Gegensatz zu der therapiebedingten Proliferationssteigerung und dem anhaltenden Neuronenverlust im OE der *Npc1*^{-/-} Mäuse, zeigt der OB der Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} eine Reduktion der BrdU(+) Zellen um 34% und eine unveränderte Anzahl dopaminerger Neurone. Bei den HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse ist die Proliferation im OB wiederum deutlich erhöht, welche mit der weiterhin deutlich gesteigerten Mikro- und Astroglie erklärt werden kann.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen Komponenten des Riechsystems unterschiedlich reagieren und die NPC1 Erkrankung einen größeren Einfluss auf die Riechschleimhaut als auf den OB hat. Dies lässt vermuten, dass das olfaktorische Neuroepithel die Schlüsselfunktion der Riechstörungen einnehmen.

5.7. Die Kombinationsbehandlung reduziert morphologische Veränderungen in den *Npc1*^{-/-} effektiver als die HPβCD-Behandlung

Obwohl in beiden Therapieformen der Wirkstoff HPβCD verwendet wird, zeigen sich dennoch Unterschiede in der Morphologie und Regeneration des Riechsystems. So ist im OE der *Npc1*^{-/-} Mäuse die Proliferationsrate nach der Monotherapie mit HPβCD allein signifikant höher als nach der Kombi-Behandlung. Die Ursache dieser Unterschiede ist nicht ganz klar, da es kaum Studien gibt, die den Zusammenhang von Zellneubildung und HPβCD untersuchen. Untersuchungen des Einflusses verschiedener Cyclodextrine auf die Proliferation von HaCaT Keratinozyten zeigten einen zytotoxischen Effekt von β-Cyclodextrin und eine erhöhte Aktivität von Caspase 3 und 7 bei Keratinozyten in vitro. Konzentrationen von 0,5% (w/v) und höher steigerten die Laktatdehydrogenase-Raten (LDH) signifikant, während Konzentrationen bis zu 0,1% (w/v) keinen antiproliferativen Einfluss zeigten und die Proliferation stattdessen eher anregten (Hipler et al. 2007). Diese Ergebnisse erlauben die Annahme, dass die HPβCD-Therapie nicht primär die Proliferation anregt, sondern die Vielzahl der neugebildeten Zellen den kompensatorischen Effekt für eine potenziell therapieinduzierte, angeregte Apoptoseaktivität zeigt. Nachweislich hat HPβCD einen Apoptose-induzierenden Effekt und wirkt antitumorös, indem es das Zellwachstum von leukämischen Zellen hemmt (Yokoo et al. 2015).

Obwohl die Quantifizierung der apoptotischen Zellen dieser Studie 28% mehr Cas-3(+) Zellen im OE der HPβCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen zeigt als nach der Kombi-Behandlung, konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden, möglicherweise aufgrund der zu

geringen Stichprobengröße. Dennoch zeigen die HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse im OE ähnlich viele BrdU(+) Zellen wie die HPßCD-behandelten Kontrollen, während die Kombi-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse signifikant weniger aufweisen. Die pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Substanzen sind bisher nicht geklärt. Möglicherweise hat Miglustat in Verbindung mit HPßCD und Allopregnanolon einen inhibitorischen oder antagonistischen Effekt. Alternativ haben die aus der Kombi-Therapie resultierenden, neugebildeten Zellen auch eine längere Lebensspanne. Folglich wäre weniger Regeneration erforderlich.

Studien des therapeutischen Potenzials von Allopregnanolon zeigten eine signifikant erhöhte Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen in Ratten und von humanen Stammzellen (Wang et al. 2005). Allopregnanolon hat einen protektiven Effekt vor oxidativem Stress und Peroxid-induzierter Apoptose auf Zellen (Zampieri et al. 2009). Da oxidativer Stress apoptotische Prozesse triggert, könnte dieser Effekt die geringeren Proliferationsraten in den Kombi-behandelten Mäusen erklären.

Weiterhin zeigt die Kombi-Behandlung eine deutliche Verbesserung der Mikrogliose, während HPßCD keinen erkennbaren entzündungshemmenden Effekt hat. Zwar kann die Astrogliose durch beide Therapien verbessert werden, aber auch hier ist die Kombination von Miglustat, Allopregnanolon und HPßCD die effektivere Behandlungsstrategie.

Trotz der vergleichsweise schlechteren morphologischen Ergebnisse nach der HPßCD-Behandlung im Vergleich zu der Kombi-Behandlung zeigen die Ergebnisse des Buried Pellet Test eine normalisierende Wirkung nach beiden Therapien. Folglich kann angenommen werden, dass der therapeutische Erfolg überwiegend auf das HPßCD zurückgeführt werden kann.

5.8. Therapieassoziierte Effekte bei NPC1^{+/+}

Um mögliche therapieassoziierte Veränderungen des Riechsystems und der Riechleistung zu erkennen, wurde die Therapie auch bei gesunden *Npc1*^{+/+} Mäusen angewendet.

Überraschenderweise zeigen beide Therapieformen einen nahezu vierfach erhöhten Proliferationsanstieg im OE der *Npc1*^{+/+} Mäuse. Dieser Effekt lässt sich aber nicht durch eine quantitative Änderung der Zahl der reifen ORN und in dem Maße auch nicht durch einhergehende apoptotische Prozesse erklären. Möglicherweise haben die gesunden *Npc1*^{+/+} Mäuse eine weniger limitierte Reserve an neuronalen Vorläuferzellen, welche durch die Behandlung zur Zellneubildung und Ausdifferenzierung angeregt werden und so die Unterschiede zwischen den Genotypen erklären könnten. Eine erhöhte apoptotische Aktivität konnte bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen im OE nicht nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass die Behandlungen apoptotische Prozesse im OE der *Npc1*^{+/+} Mäuse induzieren, konnte somit nicht bestätigt werden.

Aufgrund der nur sehr kurzen Cas-3-abhängigen Zelltodprozesse während des Zellzyklus wird wahrscheinlich aber nur ein Teil der tatsächlich stattfindenden Apoptoseprozesse detektiert. Weiterhin können auch andere Zelltod-verursachenden Prozesse wie Nekrose oder Autophagozytose nicht ausgeschlossen werden (Yuan et al. 2003). Die Ursache des massiven Proliferationsanstieges im OE der *Npc1*^{+/+} Mäuse kann nicht adäquat erklärt werden.

Im OB zeigt die Kombi-Behandlung keine nennenswerten Veränderungen in der Proliferation, Apoptose oder in der Astroglia-Aktivität bei gesunden, 8 Wochen alten *Npc1*^{+/+} Mäusen. Im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der TH(+) dopaminergen Interneurone nach einer 7-wöchigen Kombi-Behandlung detektiert werden. Ein therapieassoziiertes Einfließen auf das Gleichgewicht von Zelltod und -erneuerung kann demnach ausgeschlossen werden. Dennoch bewirkt die Kombi-Therapie eine sichtbare Mikroglia-Aktivierung bei den *Npc1*^{+/+} Mäusen, obwohl im OB unbehandelter *Npc1*^{+/+} Mäuse kein Iba1 nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung verdeutlicht sich im OB der HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse, welche zwar keine erkennbaren Veränderungen in der Immunreaktivität gegen GFAP oder Cas-3 zeigen, aber eine deutliche Reaktion von anti-Iba1 und folglich eine HPßCD-induzierte Mikroglia-Proliferation vermuten lässt.

Darüber hinaus zeigt sich bei den HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen, dass trotz der im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen um 21% reduzierten Proliferation, die Anzahl der TH(+) Neurone in diesen Tieren um 71% erhöht ist. Möglicherweise hat HPßCD nicht nur einen mitogenen Effekt, sondern beeinflusst auch die Lebensspanne der dopaminergen Interneurone und/ oder die Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen.

Verschiedene Studien zeigten eine beeinträchtigte Differenzierung verschiedener Zellen aufgrund des Cholesterols-Abbaus in den Membranen. Beispielsweise bewirkt der Abbau von membranösem Cholesterin in mit Methyl-ß-Cyclodextrin behandelten Myoblasten eine Anregung der Zellproliferation, welche in einer verstärkten Bildung und Verschmelzung von langen, mehrkernigen Myotuben resultiert (Mermelstein et al. 2005). HPßCD unterstützt die Differenzierung von murinen kardialen Stammzellen *in vivo* und hat womöglich einen protektiven Effekt (Shi et al. 2017).

Möglicherweise verursacht gerade die therapieinduzierte Mikroglia-Aktivierung die erhöhte Anzahl dopaminergischer Neurone im OB der HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse. Obwohl verschiedene Studien die Neurotoxizität von Mikroglia in NPC1 zeigen (Baudry et al. 2003; Seo et al. 2014; Seo et al. 2016), gibt es zunehmende Hinweise, dass Mikroglia das neuronale Überleben erhöht und die Proliferation anregt. In einem mit Mikroglia konditionierten Medium konnte die Lebenserwartung cerebellärer Körnerzellen von Ratten um 50% und die Proliferation der Vorläuferneurone gesteigert (Morgan et al. 2004) sowie eine erhöhte biochemische Differenzierung von cholinergen und GABAergen Neuronen während der Entwicklung des Septums nachgewiesen werden, ohne deren Überleben zu beeinträchtigen (Mazzoni und Kenigsberg 1997). Weiterhin können aktivierte Mikroglia und unstimulierte Makrophagen-ähnliche Zellen die cholinerge Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen im basalen Vorderhirn von Ratten fördern (Jonakait et al. 1996). *In vitro*

Versuche in einem mit Mikroglia-angereicherten Medium bestätigen ein erhöhtes Überleben von Neuronen des Mesencephalons und weisen darüber hinaus eine Mikroglia-induzierte, gesteigerte Aufnahme von Dopamin sowie eine signifikant höhere Anzahl TH(+) Neurone nach (Nagata et al. 1993).

Trotz der verschiedenen Theorien, welche die erhöhte Anzahl TH(+) dopaminerges Neurone im OB erklären könnten, kann nicht geklärt werden, warum die Mikroglia-Aktivität im OB der *Npc1^{+/-}* Mäuse nach der Behandlung mit HPßCD nachweisbar erhöht ist.

Auch in anderen Bereichen konnte ein therapieinduzierter Effekt bei *Npc1^{+/-}* Mäusen nach Behandlung mit Miglustat allein oder in Kombination mit Allopregnanolon und HPßCD nachgewiesen werden. Gesunde *Npc1^{+/-}* Mäuse zeigten nach einer Behandlung mit Miglustat allein oder nach der Kombi-Therapie sowohl physiologische, psychiatrische als auch kognitive Nebenwirkungen, die möglicherweise auf eine Reduktion von Cholesterol und anderen Lipiden unterhalb des Normalniveaus und damit resultierenden Veränderungen der Zell- oder Membranfunktionen zurückgeführt werden können (Schlegel et al. 2016).

Ein weiteres Beispiel für einen therapieassoziierten Effekt zeigen auch Hovakimyan et al. (2011), die die Anzahl dendritischer Zellen (DC) in der Cornea von unbehandelten und behandelten *Npc1^{+/-}* und *Npc1^{-/-}* Mäusen untersuchten. So konnten sie bei den *Npc1^{-/-}*, aber auch den *Npc1^{+/-}* Mäusen nach beiden Behandlungen, eine signifikante Steigerung der DC-Anzahl in der Cornea nachweisen und somit eine mögliche Nebenwirkung der Therapien aufzeigen.

5.9. Unterschiede im Regenerationsverhalten von OE und OB

Wie im Vorfeld mehrfach betont, reagieren der OB und das OE unterschiedlich auf die Krankheit. So ist die Proliferationsaktivität mit einer Erhöhung um 45% im OE und 42% im OB der unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ähnlich erhöht. Dennoch zeigt das OE einen massiven Verlust der reifen ORN, während die Anzahl der TH(+) dopaminergen Interneurone im OB unverändert ist. Beim Vergleich der Proliferationsdichte beider Regionen zeigt sich, dass die Anzahl der BrdU(+) Zellen pro mm² im OB um den Faktor 4,4 höher ist als im OE. Dieser Effekt ist jedoch unabhängig vom Genotyp und zeigt sich sowohl bei den unbehandelten *Npc1^{+/-}* als auch bei den unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen. Folglich ist das Regenerationspotential sowohl bei den gesunden Kontrollen als auch bei den kranken, unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen im OB deutlich höher als im OE.

Weitere Unterschiede verdeutlichen sich auch nach den beiden Behandlungsstrategien. Während die Kombi-Therapie eine nachweisbare Reduktion der Proliferationsaktivität im

OB der *Npc1*^{-/-} Mäuse bewirkt, hat HPßCD allein offenbar keinen Effekt. Die enorme, therapieassoziierte Proliferationssteigerung des OE kann im OB nicht bestätigt werden.

Der Unterschied der Proliferationsdichte wurde durch die Behandlung auf den Faktor 1,6 bei den Kombi-behandelten und 1,7 bei den HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen ähnlich stark reduziert. Eine Ausnahme dieser ähnlichen Regulation der Proliferation zeigt sich bei den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen. Hier bewirken die Therapien im OB eine ähnliche bzw. leicht geringere Proliferationsdichte als im OE. Dieser Effekt ist ausschließlich nach Behandlung der *Npc1*^{+/+} Mäuse zu beobachten. Dabei zeigen die Kombi-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse eine annähernd gleiche Proliferationsdichte von 98% im OB und die HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse nur noch 81% der Zellneubildungen, die im OE detektiert werden konnte. Warum die Proliferationsdichte der behandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse durch die Therapie so beeinflusst wird, kann nur vermutet werden (siehe Abschnitt 5.88.). Dennoch belegen diese Ergebnisse einmal mehr, dass die Therapien einen Effekt auf die gesunden *Npc1*^{+/+} Mäuse haben und, dass die einzelnen Regionen des Riechsystems unterschiedlich auf die Behandlung antworten.

Auch in anderen Bereichen konnten diese Unterschiede aufgezeigt werden. So reagiert beispielsweise das Neuroepithel (VNE) des Vomeronasalorgans (VNO) der *Npc1*^{-/-} Mäuse wiederum anders als der OB und das OE im selben Tiermodell (Witt et al. 2018). Das VNE zeigt eine deutliche Proliferationssteigerung der unbehandelten und behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse, ähnlich wie das OE. Jedoch scheint die OMP(+) Reaktivität und somit die neuronale Zellpopulation nicht beeinflusst zu sein und ähnelt dabei dem Verhalten des OB.

Auch im Kleinhirn der *Npc1*^{-/-} Mäuse konnte, ähnlich wie bei den ORN im OE, nicht nur eine signifikante Reduktion der Purkinje-Zellen und weiterer cerebellärer Neurone nachgewiesen werden, sondern ebenso eine Degeneration der dendritischen Ausläufer dieser, welche durch die Kombi-Behandlung zwar deutlich verbessert, wenngleich nicht normalisiert werden konnte (Maass et al. 2015).

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass die verschiedenen Regionen, ob Peripherie oder ZNS, unterschiedlich auf die Krankheit und die Therapien reagieren, wobei die Effekte auf die verschiedenen Zellpopulationen mitunter völlig gegensätzlich sind und man nicht von einer Region auf die andere schließen kann.

6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde das OE und der OB von 8 Wochen alten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen untersucht. Darüber hinaus wurde der therapeutische Effekt von zwei verschiedenen Behandlungen auf das olfaktorische System untersucht. Hierfür wurde eine Kombinationstherapie mit Miglustat, HPβCD und Allopregnanolon sowie eine Monotherapie mit HPβCD allein angewendet.

Für eine noch genauere Beurteilung der Plastizität des olfaktorischen Systems wären ergänzende Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sinnvoll. Auch kann abschließend nicht ganz geklärt werden, in welchem Bereich des olfaktorischen Systems die pathologischen Prozesse starten. Wenn die hier vorgestellten Untersuchungen zusätzlich zu früheren Zeitpunkten erfolgen, könnte man den tatsächlichen Beginn der Riechstörungen und den Verlauf der neurodegenerativen Prozesse besser erfassen.

Weiterhin wurden die Quantifizierungen nur für die wichtigsten Zelltypen vorgenommen. Dabei ergaben sich weitere Fragestellungen. Eine Quantifizierung der Apoptoseprozesse im OB oder eine Analyse der Nekrose beziehungsweise der Autophagozytose wäre hilfreich, um die Zellhomöostase noch genauer beurteilen zu können. Auch andere Zellgruppen, wie die unreifen ORN oder andere Neurone im OB wurden noch nicht vollständig betrachtet. Möglicherweise kann mit solchen, weiterführenden Untersuchungen auch der Verbleib der zahlreichen neugebildeten Zellen nach beiden Therapieformen geklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Behandlungsstrategien weiterhin Raum für Spekulationen lassen. So wurden Miglustat und Allopregnanolon nur in Kombination mit HPβCD untersucht. Interessant wären allerdings auch die therapeutischen Effekte auf das olfaktorische System nach alleiniger Anwendung des jeweiligen Medikaments. Dadurch wären möglicherweise auch die hier gezeigten therapieassoziierten Effekte besser nachvollziehbar.

Der Buried Pellet Surface Test überprüft nur einen bestimmten Bereich der Riechfunktion, indem er aussagt, ob eine hungrige Maus in der Lage ist, ein verstecktes Futterstück zu riechen. Hier wären ergänzende Riechtest vonnöten, um auch Aussagen über die Diskriminationsfähigkeit oder die sozialen Aspekte von Gerüchen machen zu können.

7. Thesen

- I. Morbus Niemann-Pick Typ C1 ist eine bislang nicht heilbare, neuroviszerale Lipidspeichererkrankung und wird autosomal-rezessiv vererbt.
- II. Eine Mutation des NPC1-Gens auf dem Chromosom 18 führt zu einer Störung des intrazellulären Cholesterolfstoffwechsels und zu einer Akkumulation verschiedener Lipide.
- III. Das BALB/cNctr-Npc1m1N/J-Mausmodell führt durch einen Funktionsverlust des NPC1-Proteins zu einem neuroviszeralen Krankheitsbild und entspricht dem frühen infantilen Krankheitsverlauf.
- IV. Miglustat (Handelsname Zavesca®) ist die derzeit einzig zugelassene und krankheitsspezifische Therapieoption.
- V. Riechstörungen treten bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen bis zu Jahre vor den krankheitsspezifischen Symptomen auf.
- VI. Das Riechsystem ist eine direkte Verbindung von peripherem und zentralen Nervensystem und kann lebenslang Neurone ersetzen.
- VII. Die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen eine ausgeprägte Neuropathologie in Form einer signifikant reduzierten Anzahl reifer olfaktorischer Rezeptorneurone, einer deutlich erhöhten Apoptoserate und einer gesteigerten lysosomalen Aktivität.
- VIII. Die Anzahl der dopaminergen Interneurone im Bulbus olfactorius ist bei den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse unverändert.
- IX. Die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen durchschnittlich eine signifikant schlechtere Riechleistung als die gesunden Kontrollen.
- X. Die Kombi- und die HPßCD-Behandlung verbessern sowohl die Morphopathologie im OE und OB als auch die Riechfähigkeit der *Npc1*^{-/-} Mäuse.
- XI. Die Kombi-Behandlung reduziert die Neuropathologie der *Npc1*^{-/-} Mäuse effektiver als die Behandlung mit HPßCD allein.
- XII. Die HPßCD-Behandlung kann die Riechleistung der *Npc1*^{-/-} Mäuse auf das Niveau der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse normalisieren.
- XIII. Die Proliferationsaktivität ist im OB höher als im OE und unterscheidet sich nicht zwischen den unbehandelten gesunden *Npc1*^{+/+} und kranken *Npc1*^{-/-} Mäusen.
- XIV. Beide Behandlungen erhöhen die Proliferationsaktivität im OE der *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäuse.
- XV. Die HPßCD-Behandlung zeigt therapieassoziierte Effekte in Form einer erhöhten Anzahl dopaminergener Interneurone und einer gesteigerten Mikroglia-Reaktivität im OB der *Npc1*^{+/+} Mäuse.

8. Danksagung

Ein spannendes und lehrreiches Kapitel neigt sich dem Ende. Daher möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Dr. h. c. Witt bedanken, für das Vertrauen meine Dissertation zu betreuen, die konstruktive Kritik zu jeder Tageszeit und die Freiheiten, die ich während der gesamten Zeit genießen durfte. Ich habe es nie als selbstverständlich erachtet.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wree bedanken, der mir als ehemaliger Institutsdirektor mit meiner Anstellung im Institut für Anatomie erst die Tür für die medizinische Forschung öffnete und mir ermöglichte, über einige Jahre ein Teil seines Teams sein zu dürfen. In diesem Sinne danke ich auch seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Kipp für die Möglichkeit in seinem Institut promovieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. Schmidt möchte ich für die geduldige Einführung in die Stereomikroskopie und die statistische Auswertung danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Susann Lehmann, die nicht nur ihr Labor mit mir teilte und mich immer unterstützte, sondern auch eine gute Freundin geworden ist. Ich hätte mir keine bessere Kollegin wünschen können.

Auch bei allen anderen Institutsmitarbeitern und zeitweiligen Kollegen möchte ich mich bedanken, sei es für die Unterstützung im Tierstall, für die Anregungen und Denkanstöße oder einfach auch mal für die kurzweiligen Unterhaltungen, die den Arbeitsalltag auflockerten. Eine vollständige Aufzählung würde den Rahmen sprengen, aber Dr.med. René Thiemer, Dr. rer. nat. Steve Hildebrandt, Nils Schmidt, Mathias Lietz, Jana Weiß-Müller, Marko Schulze und Heike Brückmann möchte ich gern namentlich nennen.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die Zuversicht, den stetigen Zuspruch und die Unterstützung im Alltag danken. Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Andreas Müller bedanken, der mich immer geduldig unterstützt, motiviert und mir den Rücken freigehalten hat. Unseren Kindern, Julius und Elisa, möchte ich für die bedingungslose und erdende Liebe danken. Manchmal muss man den Fokus zurück auf das Wesentliche richten.

Die letzten Jahre haben mich sowohl fachlich als auch menschlich sehr bereichert. Ich bin dankbar für diese Erfahrungen und freue mich nun auf weitere Meilensteine.

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammenfassung der verwendeten Primärantikörper mit der jeweiligen Wirtspezies, der angewendeten Verdünnung, dem Hersteller und der dargestellten Zielstruktur.	39
Tabelle 2 Übersicht der Quantifizierungsparameter der verschiedenen Gewebe und Antikörperreaktionen. Detailliertere Informationen siehe Text.	41
Tabelle 3 Übersicht der Quantifizierungsergebnisse im OE. Die Zelldichten der proliferierenden BrdU(+), der reifen OMP(+) ORN und der apoptotischen Cas-3(+) Zellen zeigen in Abhängigkeit des Genotyps und der Behandlung Veränderungen. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM der Zelldichte in Zellen/mm ³ angegeben.	54
Tabelle 4 Übersicht der Quantifizierungsergebnisse im OB. Die Zelldichten der proliferierenden BrdU(+) und der dopaminergen TH(+) Interneurone zeigen in Abhängigkeit des Genotyps und der Behandlung Veränderungen. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM der Zelldichte in Zellen/mm ³ angegeben.	64
Tabelle 5 Zusammenfassung der Latenzen des Buried und Surface Pellet Tests. Die sham-behandelten <i>Npc1</i> ^{-/-} Mäuse benötigen im Buried Pellet Test im Durchschnitt fast die 3fache Zeit als die sham-behandelten Kontrollen, während sich die behandelten <i>Npc1</i> ^{-/-} und <i>Npc1</i> ^{+/+} Mäuse kaum noch voneinander unterscheiden. Der Surface Pellet Test zeigt hingegen keine nennenswerten Auffälligkeiten. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.	73

10. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Strukturelle Übersicht des OE (H.E.-Färbung)** (A) Frontalschnitt der Nasenhöhle einer 56 Tage alten *Npc1^{+/+}* Maus (Skalierungsbalken entspricht 500µm) (B) Querschnitt durch die Riechschleimhaut mit der Lamina propria (LP) und dem OE. Das OE zeigt einen mehrreihigen Aufbau aus Basalzellen (BC), olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) und Stützzellen (SC). Die ORN ragen mit ihrem mit Zilien besetzten dendritischen Kopf (DK) in den luminalen Bereich der Nasenhöhle. (Skalierungsbalken entspricht 30µm) 13
- Abbildung 2 Vereinfachtes Modell der Neurogenese und Differenzierung im OE.** (Abbildung modifiziert nach Beites et al. 2005 und Iwai et al. 2008): Globöse Basalzellen (GBZ) im OE können Mash1(+) Zellen produzieren, welche wiederum INP-Zellen (immediate neuronal precursor) generieren und zu olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) ausdifferenzieren können. Weiterhin können sie aber auch nicht-neuronale Zellen ersetzen wie die olfaktorischen Hüllzellen (OHZ) und die Stützzellen (SZ). Horizontale Basalzellen (HBC) können sich selbst erneuern oder zu globösen Basalzellen (GBC) und somit auch weiter zu ORN differenzieren. Weiterhin können sie Stützzellen regenerieren. Sowohl die GBZ als auch die HBZ können Neurone generieren. 15
- Abbildung 3 Histologischer Überblick der peripheren und zentralen olfaktorischen Strukturen.** (A) Frontalschnitt der vorderen Schädelhöhle einer Maus zeigt den paarigen Bulbus olfactorius (OB) und die Nasenhöhle mit den mit Riechschleimhaut ausgekleideten Nasenmuscheln und Septum. (Skalierungsbalken entspricht 500µm) (B) Querschnitt des OB mit den sechs Schichten: die olfaktorische Nervenfaserschicht (ONL), die glomeruläre Schicht (GL), die externe plexiforme Schicht (EPL), die Mitralzellschicht (MCL), die interne plexiforme Schicht (IPL) und die Körnerzellschicht (GCL). (Skalierungsbalken entspricht 100µm) (aus Meyer et al. 2018). 17
- Abbildung 4 Verschaltung der Projektions- und Interneurone im OB.** Die in der SVZ gebildeten Neuroblasten migrieren über den rostral migratory stream (RMS) tangential zum OB und breiten sich vom Zentrum radial in die verschiedenen Schichten des OB aus. Dort differenzieren sie in entweder in Körnerzellen oder periglomeruläre Zellen (PG) aus. Durch synaptische Verknüpfungen mit den Büschel- und Mitralzellen modulieren sie die Weiterleitung der einkommenden Signale der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN). (Abbildung modifiziert aus Lledo et al. 2006). 19
- Abbildung 5 Möglicher Mechanismus des NPC1/NPC2-abhängigen Cholesterol-Transports.** Das in Form von LDL endozytose aufgenommene Cholesterol wird durch eine Lipase hydrolysiert (1). Das dadurch freigesetzte unveresterte Cholesterol wird über das NPC2-Protein zum membranständigen NPC1-Protein transportiert (2). Dort wird es von der lysosomalen auf die zytosolische Seite (3) und mithilfe von ORP5 zum endoplasmatischen Retikulum transportiert (4). Das membrangebundene Cholesterol wird dabei über ORP1L detektiert und der weitere Transport durch einen RAB7/RILP-Komplex gesteuert (5). Eine NPC1-Defizienz (6) resultiert in einer toxischen Akkumulation von unverestertem Cholesterol in der LE/L Membran und einem gestörten Lipidtransport (7). (Details siehe Text, Abbildung modifiziert aus Neefjes und van der Kant 2014) 23
- Abbildung 6 Systemische und neurologische Beteiligung bei NPC.** Schematische Darstellung der verschiedenen Formen von NPC, dem Krankheitsbeginn und der typischen Symptome. Die Darstellung zeigt die Heterogenität der Krankheit. (modifiziert nach Patterson et al. 2012, Vanier 2010) 25
- Abbildung 7 Strukturformel von Miglustat (Zavesca®, N-butyl-deoxynojirimycin, C₁₀H₂₁NO₄).** Miglustat ist ein kleiner N-alkylierter Iminozucker, der reversibel die Glucosylceramidsynthase hemmt. Die linke Seite zeigt die Struktur in 2D und rechts in 3D (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database). 27
- Abbildung 8 Strukturformel von Allopregnanolon (Pregnan-3-alpha-ol-20-one, C₂₁H₃₄O₂).** Allopregnanolon ist ein endogenes Neurosteroid, welches aus Progesteron synthetisiert wird und als allosterischer Modulator des GABA-A-Rezeptors fungiert. Die linke Seite zeigt die Struktur in 2D und rechts in 3D. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database.) 29
- Abbildung 9 Strukturformel von Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (HPβCD, C₅₄H₁₀₂O₃₉).** HPβCD ist ein zyklisches Oligosaccharid, welches aus 7 Glucose-Bausteinen besteht. Die Kavität im Zentrum ermöglicht den Einschluss und Transport apolarer, organischer Substanzen. Die Darstellung erfolgt aufgrund der Komplexität des Moleküls nur in 2D. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database) 31
- Abbildung 10 Übersicht der Kombinations- und der HPβCD-Behandlung.** Sowohl die *Npc1^{+/+}* als auch die *Npc1^{-/-}* Mäuse wurden je nach Behandlungsgruppe ab Tag P7 regelmäßig mit Miglustat, Allopregnanolon und HPβCD behandelt. Für die Analyse der Proliferationsaktivität wurde den Mäusen zusätzlich BrdU injiziert. 37

- Abbildung 11 Übersicht der Vorbereitung und Durchführung des Buried Pellet Test.** 43
- Abbildung 12 Ergebnisse der H.E. Übersichtsfärbung im OE.** Das OE der unbehandelten *Npc1^{+/+}* Mäuse zeigt eine typisch säulenartige Struktur mit zahlreichen ORN (A). Unbehandelte *Npc1^{-/-}* Mäuse zeigen deutliche morphologische Veränderungen mit einer sichtbar reduzierten Zelldichte und einer kaum erhaltenen Schichtung (B). Sowohl die Kombi-behandelten *Npc1^{-/-}* (D) als auch HPßCD-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse (F) weisen eine signifikante Verbesserung der Morphologie auf und sind kaum noch von den Kontrollen zu unterscheiden. Die Kombi- (C) und HPßCD- behandelten *Npc1^{+/+}* (E) demonstrieren ein normales Profil. (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.) 45
- Abbildung 13 Immunhistochemischer Nachweis von BrdU(+) proliferierenden Zellen im OE.** Proliferierende Zellen der unbehandelten *Npc1^{+/+}* Mäuse (A) befinden sich überwiegend im basalen Drittel des OE (Pfeile). (B) In den unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen sind die BrdU(+) Zellen in Clustern im basalen Bereich, aber auch im Bereich der ORN und Stützzellen. Die Höhe des Epithels ist sichtbar reduziert. Die Kombi-behandelten *Npc1^{-/-}* (D) und die HPßCD-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse (F) weisen eine erhöhte Proliferationsaktivität auf mit weniger clusterartigen Ansammlungen, sondern regelmäßig verteilten BrdU(+) Zellen. Sowohl die Kombi-behandelten *Npc1^{+/+}* (C) als auch die HPßCD-behandelten *Npc1^{+/+}* Mäusen zeigen in allen epithelialen Schichten eine deutlich höhere Proliferationsaktivität auf als die unbehandelten Kontrollen (A). (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.) 46
- Abbildung 14 Quantitative Analyse der Proliferationsaktivität im OE** zeigt sowohl in den unbehandelten, Kombi- und HPßCD- behandelten *Npc1^{+/+}* und *Npc1^{-/-}* Mäusen einen deutlichen Anstieg der Anzahl der neu gebildeten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1^{+/+}* Mäusen. Beide Behandlungen resultieren in einer deutlichen Proliferationssteigerung sowohl bei den *Npc1^{+/+}* als auch den *Npc1^{-/-}* Mäusen. Die HPßCD-Behandlung bewirkt eine höhere Proliferationsdichte als die Kombi-Therapie bei den *Npc1^{+/+}* und *Npc1^{-/-}* Mäusen. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. *p*-Werte < 0,05 werden als signifikant gewertet (* *p* < 0,05). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1^{+/+}* n=4, Kombi *Npc1^{+/+}* n=4, HPßCD *Npc1^{+/+}* n=4, unbehandelte *Npc1^{-/-}* n=4, Kombi *Npc1^{-/-}* n=4, HPßCD *Npc1^{-/-}* n=4) 47
- Abbildung 15 Immunreaktivität von OMP(+) reifen ORN im OE.** (A) Unbehandelten *Npc1^{+/+}* zeigen eine ausgeprägte Schicht säulenartig angeordneter reifer ORN. Die basale Zellschicht lässt sich dabei gut von den reifen ORN-Schicht und der Lamina propria (LP) unterscheiden. (B) Bei den unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen sind nur noch wenige ORN im oberen Drittel nachweisbar; die Struktur wirkt lückenhaft. Sowohl die Kombi- (D) als auch die HPßCD-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse (F) besitzen wieder eine deutliche Schicht von noch erhaltenen oder bereits ersetzten reifen ORN. Dennoch ist die basale Zellschicht nicht eindeutig abgrenzbar und die Zellen sind weniger organisiert. Im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1^{+/+}* Mäusen zeigen die Kombi-behandelten *Npc1^{+/+}* (C) und die HPßCD-behandelten *Npc1^{+/+}* Mäuse (E) keine Veränderungen in der OMP(+) Immunreaktivität. (ON: olfaktorisches Nervenfaserbündel in der LP. Skalierungsbalken entspricht 20 µm.) 49
- Abbildung 16 Ergebnisse der Quantifizierung der OMP(+) Zellen im OE.** Die Quantifizierung der OMP(+) Zellen im OE der sechs Behandlungsgruppen zeigt eine signifikante Reduktion der reifen ORN in den unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäusen, welche durch beide Therapieformen teilweise kompensiert werden kann. Die Kombi-behandelten *Npc1^{-/-}* profitieren dabei mehr von der Therapie als die HPßCD-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse. In den gesunden *Npc1^{+/+}* Mäusen kann kein therapieinduzierter Effekt auf die Anzahl der reifen ORN nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM angegeben. *p*-Werte < 0,05 werden als signifikant gewertet (* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1^{+/+}* n=5, Kombi *Npc1^{+/+}* n=6, HPßCD *Npc1^{+/+}* n=6, unbehandelte *Npc1^{-/-}* n=5, Kombi *Npc1^{-/-}* n=6, HPßCD *Npc1^{-/-}* n=4) 50
- Abbildung 17 Immunhistochemischer Nachweis Cas-3(+) apoptotischer Zellen im OE.** Die unbehandelten *Npc1^{+/+}* Mäuse (A) zeigen nur gelegentlich apoptotische Zellen (Pfeil), während die unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse (B) eine deutlich gesteigerte Immunreaktivität gegen Cas-3 im Bereich der Basalzellen und ORN zeigt. Im Vergleich dazu zeigen die Kombi-behandelten (D) und HPßCD-behandelten (F) *Npc1^{-/-}* Mäuse eine Reduktion der Apoptoseaktivität. Die lichtmikroskopische Auswertung zeigt keine erkennbaren Veränderungen der Cas-3 Reaktivität in den Kombi- (C) oder HPßCD-behandelten (E) *Npc1^{+/+}* Mäusen. (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.) 52
- Abbildung 18 Ergebnisse der Quantifizierung der Cas-3(+) Zellen im OE.** Die Quantifizierung der Cas-3(+) apoptotischen Zellen im OE der sechs Behandlungsgruppen zeigt eine signifikante Erhöhung der Apoptoseaktivität im OE der unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse, welche durch beide Behandlungen deutlich reduziert wird. Die Kombi-Behandlung ist dabei effektiver als die HPßCD-Behandlung. Die behandelten *Npc1^{+/+}* zeigen keine signifikanten, therapieinduzierten Veränderungen in der Apoptoserate. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM angegeben. *p*-Werte < 0,05 werden als signifikant gewertet (*

- $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1*^{+/+} n=4, Kombi *Npc1*^{+/+} n=4, HPßCD *Npc1*^{+/+} n=5, unbehandelte *Npc1*^{-/-} n=5, Kombi *Npc1*^{-/-} n=5, HPßCD *Npc1*^{-/-} n=6) 53
- Abbildung 19 Immunreaktivität der GAP43(+) unreifen ORN.** Die neugebildeten GAP43(+) Zellen sind in den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen regelmäßig im basalen Bereich verteilt (A). In den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen scheint diese Verteilung eher clusterartig angehäuft und mehr in den mittleren Bereich verschoben (B). Dieser Effekt kann durch die Kombi- (D) und die HPßCD-Behandlung (F) verbessert werden. In den gesunden *Npc1*^{+/+} Mäusen konnte weder nach der Kombi- (C) noch der HPßCD-Behandlung (E) ein therapieinduzierter Effekt gezeigt werden. (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.) 55
- Abbildung 20 Immunhistochemischer Nachweis von CathD im OE.** Weder in den unbehandelten (A) noch in den Kombi- (C) und HPßCD- behandelten (E) *Npc1*^{+/+} Mäusen konnte CathD nachgewiesen werden. Stattdessen zeigten die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse regelmäßig verteilt große, CathD(+) Makrophagen-ähnliche Zellen (B), welche überwiegend in der basalen Schicht auftreten (Pfeile). Sowohl die Kombi- (D) als auch die HPßCD-behandelten (F) *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen zwar weiterhin in regelmäßigen Abständen diese Einschlüsse, allerdings weniger häufig und in deutlich kleinerem Umfang (Pfeile). Ein Unterschied in der CathD-Immunreaktivität zwischen beiden Therapieformen kann nicht beobachtet werden. (Skalierungsbalken entspricht 20 µm.) 56
- Abbildung 21 Ergebnisse der H.E. Übersichtsfärbung im OB.** Der OB der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (A) zeigt den typischen Schichtaufbau beginnend von außen mit der Nervenfaserschicht (ONL), der glomerulären Schicht (GL), der externen plexiformen Schicht (EPL), der Mitralzellschicht (MCL), der internen plexiformen Schicht (IPL) und der Körnerzellschicht (GCL) im Zentrum. Dieser Aufbau ist ohne morphologische Veränderungen sowohl in den unbehandelten *Npc1*^{-/-} (B) als auch in den behandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} Mäusen (C – F) erkennbar. (Skalierungsbalken entspricht 100 µm.) 57
- Abbildung 22 Immunhistochemischer Nachweis von BrdU(+) proliferierenden Zellen im OB.** Im OB der unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (A) sind in allen Schichten regelmäßig proliferierende BrdU(+) Zellen nachweisbar (Pfeile). In den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen zeigt sich eine deutliche Proliferationssteigerung (B), welche durch die Kombi-Behandlung (D) nahezu normalisiert wird. Die HPßCD-Behandlung (F) hat bei den *Npc1*^{-/-} Mäusen hingegen keinen nennenswerten Effekt. Die lichtmikroskopische Beurteilung der beiden Behandlungen hat im OB der *Npc1*^{+/+} Kontrollen keinen erkennbaren Effekt auf die Anzahl der BrdU(+) Zellen (C, E). (Skalierungsbalken entspricht 50 µm.) 58
- Abbildung 23 Quantitative Analyse der Proliferationsaktivität im OB.** Die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse zeigen einen sichtbaren Anstieg der proliferierenden Zellen, welche zwar durch die Kombi-Behandlung, nicht aber durch die HPßCD-Behandlung normalisiert werden kann. In den *Npc1*^{+/+} Mäusen kann kein therapiebedingter Effekt auf die Proliferationsaktivität nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. p -Werte $< 0,05$ werden als signifikant gewertet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1*^{+/+} n=6, Kombi *Npc1*^{+/+} n=9, HPßCD *Npc1*^{+/+} n=5, unbehandelte *Npc1*^{-/-} n=7, Kombi *Npc1*^{-/-} n=5, HPßCD *Npc1*^{-/-} n=7) 59
- Abbildung 24 Vergleich der Proliferationsdichte von OE und OB.** Für den Vergleich der Proliferationsaktivität zwischen dem OE und dem OB wurde die Anzahl der BrdU(+) proliferierenden Zellen im OE auf 100 % gesetzt (horizontale schwarze Linie) und mit der relativen Dichte der BrdU(+) Zellen des OB verglichen. In den unbehandelten *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-} ist die Anzahl der neu gebildeten Zellen je mm³ unabhängig vom Genotyp um das 4,4fache höher als im OE. In den *Npc1*^{-/-} Mäusen ist das Regenerationspotential im OB durch beide Behandlungen ähnlich stark auf 160% nach der Kombi- und 170% der BrdU(+) Zelldichte im Vergleich zum OE nach der HPßCD-Behandlung reduziert. Nur in den behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen ist die Proliferationsdichte im OE höher als im OB. 61
- Abbildung 25 Immunreaktivität von TH(+) dopaminergen Interneuronen im OB.** Die unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäuse (A) zeigen eine deutliche TH(+) Immunreaktivität der perglomerulären Zellen und der Glomeruli. Letztere sind in den unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäusen (B) sichtbar schwächer gefärbt und kaum voneinander abgrenzbar. Sowohl die Kombi- als auch die HPßCD-Behandlung zeigen eine Normalisierung der TH(+) Immunreaktivität in den *Npc1*^{-/-} Mäusen (D, F), während in den gesunden Kontrollen in der lichtmikroskopischen qualitativen Beurteilung keine eindeutigen Veränderungen zeigen (C, E). (Skalierungsbalken entspricht 50 µm.) 62
- Abbildung 26 Quantitative Analyse der TH(+) dopaminergen Interneurone im OB.** Überraschenderweise zeigen die unbehandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse keine Veränderung in der Anzahl der dopaminergen Interneurone im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen. Stattdessen zeigen sowohl die *Npc1*^{+/+} als auch die *Npc1*^{-/-} Mäuse nach der Kombi-Therapie eine nur leicht erhöhte Anzahl TH(+) Neurone. Im Gegensatz dazu kann in den HPßCD-behandelten *Npc1*^{+/+} Mäusen ein signifikanter Anstieg der TH(+) Neurone nachgewiesen werden. Eine ähnliche Tendenz zeigen auch die HPßCD-behandelten *Npc1*^{-/-} Mäuse. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM angegeben. p -Werte $< 0,05$ werden als

signifikant gewertet (* $p < 0,05$). (Stichprobengröße je Behandlungsgruppe: unbehandelte *Npc1^{+/-}* n=3, Kombi *Npc1^{+/-}* n=3, HPßCD *Npc1^{+/-}* n=3, unbehandelte *Npc1^{-/-}* n=3, Kombi *Npc1^{-/-}* n=3, HPßCD *Npc1^{-/-}* n=3)

63

Abbildung 27 Nachweis der Iba1(+) Mikrogliaaktivität im OB. Im OB der unbehandelten *Npc1^{+/-}* Mäuse konnten keine Iba1(+) Zellen nachgewiesen werden (A). Im Gegensatz dazu zeigen die unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse eine deutliche Mikrogliose (B), die durch die Kombi-Behandlung (D) deutlich reduziert werden kann, nicht aber durch die HPßCD-Behandlung (F). Stattdessen zeigen sowohl die Kombi- als auch die HPßCD-behandelten *Npc1^{+/-}* Mäuse eine therapiinduzierte Mikroglia-Aktivierung (C, E). (Skalierungsbalken entspricht 50 µm.)

65

Abbildung 27 Nachweis der GFAP(+) Makrogliaaktivität im OB. Im Vergleich zu den unbehandelten *Npc1^{+/-}* Mäusen (A) zeigen die unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse eine so deutliche Astrogliose, dass eine Abgrenzung der einzelnen Schichten des OB kaum noch möglich ist (B). Beide Therapien können diesen Effekt in den *Npc1^{-/-}* Mäusen verbessern, wobei die Kombi-Behandlung (D) einen größeren Benefit zu haben scheint als die HPßCD-Behandlung (F). Die behandelten *Npc1^{+/-}* Mäuse zeigen keinen Unterschied nach der Behandlung (C, E). (Skalierungsbalken entspricht 50 µm.)

66

Abbildung 28 Immunhistochemischer Nachweis Cas-3(+) apoptotischer Zellen im OB. Sowohl die unbehandelten (A) als auch die behandelten *Npc1^{+/-}* Mäuse (C, E) zeigen nur gelegentlich apoptotische Zellen (Pfeil). Im Gegensatz dazu demonstrieren die unbehandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse (B) eine deutlich gesteigerte Immunreaktivität gegen Cas-3 überwiegend im Bereich der GCL. Im Vergleich dazu zeigen die Kombi-behandelten (D) und HPßCD-behandelten (F) *Npc1^{-/-}* Mäuse eine Reduktion der Apoptoseaktivität. Die lichtmikroskopische Auswertung zeigt keine erkennbaren Veränderungen der Cas-3 Reaktivität in den Kombi- (C) oder HPßCD-behandelten (E) *Npc1^{+/-}* Mäusen. Eine erhöhte Apoptoseaktivität nach der HPßCD-Behandlung kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. (Skalierungsbalken entspricht 10 µm.)

67

Abbildung 29 Ergebnisse der Buried Pellet Test. Die sham-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse riechen im Durchschnitt mit einer nahezu 3-fach erhöhten Latenzzeit signifikant schlechter als die sham-behandelten Kontrollen. Die gestörte Riechfunktion der *Npc1^{-/-}* Mäuse kann aber sowohl durch die Kombi- als auch durch die HPßCD-Behandlung wieder auf das Niveau der Kontrollen normalisiert werden. Bei den behandelten *Npc1^{+/-}* Mäusen kann kein therapieassoziierter Effekt auf die olfaktorische Leistung festgestellt werden. Alle Ergebnisse sind in Form eines Box-Plot Diagramms dargestellt, welches den Median, Minimum und Maximum, die Quartile und Ausreißer (Stern, Kreis) beschreibt. p -Werte $< 0,05$ werden als signifikant gewertet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

70

Abbildung 30 Kategorisierung der Latenzen des Buried Pellet Test. Die Ergebnisse des Buried Pellet Tests zeigen ein weites Spektrum unterschiedlicher Latenzen. Während 95% der sham-behandelten *Npc1^{+/-}* Mäuse das vergrabene Futterstück innerhalb von 2 min fanden, schafften dieses nur 56% der sham-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse, wobei bei 25% dieser Gruppe den Test nicht erfolgreich beendeten. Nach der Behandlung konnten wiederum 93% der Kombi-behandelten und sogar 100% der HPßCD-behandelten *Npc1^{-/-}* Mäuse den Test innerhalb von 2 min. Bei den behandelten *Npc1^{+/-}* Kontrollen konnte kein nennenswerter Unterschied in der Riechleistung detektiert werden. (Die Zahl in den Kästchen repräsentiert die prozentuale Anzahl der Mäuse, die den Test innerhalb der Zeitspanne beendeten.)

71

Abbildung 31 Ergebnisse des Surface Pellet Test. Alle getesteten Mäuse fanden das auf der Streuoberfläche befindliche Futterstück innerhalb von weniger als 1 Minute, unabhängig vom Genotyp oder der Behandlung. Die Latenzen variieren hierbei von 1 s bis zu maximal 47 s. Eine Beeinträchtigung der getesteten Mäuse in ihren motorischen Fähigkeiten und in der Motivation zur Futtersuche kann ausgeschlossen werden. Alle Ergebnisse sind in Form eines Box-Plot Diagramms dargestellt, welches den Median, Minimum und Maximum, die Quartile und Ausreißer (Stern, Kreis) beschreibt. p -Werte $< 0,05$ werden als signifikant gewertet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

73

6. Literaturverzeichnis

- Abel, L. A.; Walterfang, M.; Fietz, M.; Bowman, E. A.; Velakoulis, D. (2009): Saccades in adult Niemann-Pick disease type C reflect frontal, brainstem, and biochemical deficits. In: *Neurology* 72 (12), S. 1083–1086. DOI: 10.1212/01.wnl.0000345040.01917.9d.
- Altman, J. (1969): Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. In: *J. Comp. Neurol.* 137 (4), S. 433–457. DOI: 10.1002/cne.901370404.
- Alvarez, Alejandra R.; Klein, Andrés; Castro, Juan; Cancino, Gonzalo I.; Amigo, Julio; Mosqueira, Matías et al. (2008): Imatinib therapy blocks cerebellar apoptosis and improves neurological symptoms in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (10), S. 3617–3627. DOI: 10.1096/fj.07-102715.
- Alvarez-Buylla, A.; García-Verdugo, J. M.; Tramontin, A. D. (2001): A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2 (4), S. 287–293. DOI: 10.1038/35067582.
- Alvarez-Buylla, Arturo; García-Verdugo, Jose Manuel (2002): Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. In: *J. Neurosci.* 22 (3), S. 629–634. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002.
- Amritraj, A.; Wang, Y.; Revett, T. J.; Vergote, D.; Westaway, D.; Kar, S. (2013): Role of Cathepsin D in U18666A-induced Neuronal Cell Death. POTENTIAL IMPLICATION IN NIEMANN-PICK TYPE C DISEASE PATHOGENESIS. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (5), S. 3136–3152. DOI: 10.1074/jbc.M112.412460.
- Aqul, Amal; Liu, Benny; Ramirez, Charina M.; Pieper, Andrew A.; Estill, Sandi Jo; Burns, Dennis K. et al. (2011): Unesterified cholesterol accumulation in late endosomes/lysosomes causes neurodegeneration and is prevented by driving cholesterol export from this compartment. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (25), S. 9404–9413. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1317-11.2011.
- Arnold, Steven E.; Lee, Edward B.; Moberg, Paul J.; Stutzbach, Lauren; Kazi, Hala; Han, Li-Ying et al. (2010): Olfactory epithelium amyloid- β and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. In: *Ann Neurol.* 67 (4), S. 462–469. DOI: 10.1002/ana.21910.
- Attems, J.; Jellinger, K. A. (2006): Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. In: *Clinical neuropathology* 25 (6), S. 265–271.
- Au, Edmund; Roskams, A. Jane (2003): Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. In: *Glia* 41 (3), S. 224–236. DOI: 10.1002/glia.10160.
- Baker, Harriet; Morel, Kimberly; Stone, Donna M.; Maruniak, Joel A. (1993): Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. In: *Brain Research* 614 (1-2), S. 109–116. DOI: 10.1016/0006-8993(93)91023-L.
- Baldisseri, Donna M.; Margolis, Joyce W.; Weber, David J.; Koo, Jae Hyung; MARGOLIS, FRANK L. (2002): Olfactory Marker Protein (OMP) Exhibits a β -Clam Fold in Solution. Implications for Target Peptide Interaction and Olfactory Signal Transduction. In: *Journal of Molecular Biology* 319 (3), S. 823–837. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00282-6.
- Bardai, Farah H.; Price, Valerie; Zaayman, Marcus; Wang, Lulu; D'Mello, Santosh R. (2012): Histone deacetylase-1 (HDAC1) is a molecular switch between neuronal survival and death. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (42), S. 35444–35453. DOI: 10.1074/jbc.M112.394544.

Barnett, Susan C.; Riddell, John S. (2004): Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats. In: *Journal of anatomy* 204 (1), S. 57–67. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2004.00257.x.

Barrios, Fernando A.; Gonzalez, Leopoldo; Favila, Rafael; Alonso, Maria E.; Salgado, Perla M.; Diaz, Rosalinda; Fernandez-Ruiz, Juan (2007): Olfaction and neurodegeneration in HD. In: *Neuroreport* 18 (1), S. 73–76. DOI: 10.1097/WNR.0b013e3280102302.

Baudry, Michel; Yao, Yuequin; Simmons, Danielle; Liu, Jihua; Bi, Xiaoning (2003): Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann–Pick type C disease. Immunohistochemical observations of microglia and astroglia. In: *Experimental Neurology* 184 (2), S. 887–903. DOI: 10.1016/S0014-4886(03)00345-5.

Beites, Crestina L.; Kawauchi, Shimako; Crocker, Candice E.; Calof, Anne L. (2005): Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. In: *Experimental cell research* 306 (2), S. 309–316. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.03.027.

Berendse, Henk W.; Booij, Jan; Francot, Chantal M. J. E.; Bergmans, Paul L. M.; Hijman, Ron; Stoof, Johannes C.; Wolters, Erik Ch. (2001): Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decreased sense of smell. In: *Ann Neurol.* 50 (1), S. 34–41. DOI: 10.1002/ana.1049.

Blanchart, Albert; Carlos, Juan A. de; López-Mascaraque, Laura (2006): Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. In: *J. Comp. Neurol.* 496 (4), S. 529–543. DOI: 10.1002/cne.20941.

Boustany, R. N.; Kaye, E.; Alroy, J. (1990): Ultrastructural findings in skin from patients with Niemann–Pick disease, type C. In: *Pediatric neurology* 6 (3), S. 177–183. DOI: 10.1016/0887-8994(90)90059-a.

Brady, R. O.; Kanfer, J. N.; Mock, M. B.; Fredrickson, D. S. (1966): The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann–Pick disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55 (2), S. 366–369. DOI: 10.1073/pnas.55.2.366.

Brinton, R. D. (1994): The neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. In: *J. Neurosci.* 14 (5), S. 2763–2774. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.14-05-02763.1994.

Brussaard, A. B.; Wossink, J.; Lodder, J. C.; Kits, K. S. (2000): Progesterone-metabolite prevents protein kinase C-dependent modulation of gamma-aminobutyric acid type A receptors in oxytocin neurons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (7), S. 3625–3630. DOI: 10.1073/pnas.050424697.

Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. (2000): Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis: application to lysosomal storage disorders. In: *Chemical reviews* 100 (12), S. 4683–4696.

Callahan, L. M.; Vaules, W. A.; Coleman, P. D. (1999): Quantitative decrease in synaptophysin message expression and increase in cathepsin D message expression in Alzheimer disease neurons containing neurofibrillary tangles. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58 (3), S. 275–287.

Calof, Anne L.; Bonnin, Alexandre; Crocker, Candice; Kawauchi, Shimako; Murray, Richard C.; Shou, Jianyong; Wu, Hsiao-Huei (2002): Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. In: *Microscopy research and technique* 58 (3), S. 176–188. DOI: 10.1002/jemt.10147.

Calof, Anne L.; Chikaraishi, Dona M. (1989): Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: Proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. In: *Neuron* 3 (1), S. 115–127. DOI: 10.1016/0896-6273(89)90120-7.

Calof, Anne L.; Guevara, Jose L. (1993): Cell Lines Derived from Retrovirus-Mediated Oncogene Transduction into Olfactory Epithelium Cultures. In: *Neuroprotocols* 3 (3), S. 222–231. DOI: 10.1006/ncmn.1993.1057.

Camargo, Fernando; Erickson, Robert P.; Garver, William S.; Hossain, G. Showkat; Carbone, Peter N.; Heidenreich, Randall A.; Blanchard, James (2001): Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. In: *Life Sciences* 70 (2), S. 131–142. DOI: 10.1016/s0024-3205(01)01384-4.

Carleton, Alan; Petreanu, Leopoldo T.; Lansford, Rusty; Alvarez-Buylla, Arturo; Lledo, Pierre-Marie (2003): Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. In: *Nat. Neurosci.* 6 (5), S. 507–518. DOI: 10.1038/nn1048.

Carr, Virginia McM; Farbman, Albert I. (1993): The Dynamics of Cell Death in the Olfactory Epithelium. In: *Experimental Neurology* 124 (2), S. 308–314. DOI: 10.1006/exnr.1993.1201.

Carstea, E. D.; Morris, J. A.; Coleman, K. G.; Loftus, S. K.; Zhang, D.; Cummings, C. et al. (1997): Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5323), S. 228–231. DOI: 10.1126/science.277.5323.228.

Cataldo, A. M.; Paskevich, P. A.; Kominami, E.; Nixon, R. A. (1991): Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease. In: *PNAS* 88 (24), S. 10998–11002. Online verfügbar unter <http://www.pnas.org/content/88/24/10998.full.pdf>.

Chen, Fannie W.; Gordon, Ronald E.; Ioannou, Yiannis A. (2005): NPC1 late endosomes contain elevated levels of non-esterified ('free') fatty acids and an abnormally glycosylated form of the NPC2 protein. In: *The Biochemical journal* 390 (Pt 2), S. 549–561. DOI: 10.1042/BJ20050236.

Chen, Gang; Li, Hai-Min; Chen, Yi-Ren; Gu, Xiao-Song; Duan, Shumin (2007): Decreased estradiol release from astrocytes contributes to the neurodegeneration in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. In: *Glia* 55 (15), S. 1509–1518. DOI: 10.1002/glia.20563.

Chiasson, B. J.; Tropepe, V.; Morshead, C. M.; van der Kooy, D. (1999): Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. In: *J. Neurosci.* 19 (11), S. 4462–4471.

Chien, Y. H.; Peng, S. F.; Yang, C. C.; Lee, N. C.; Tsai, L. K.; Huang, A. C. et al. (2013): Long-term efficacy of miglustat in paediatric patients with Niemann-Pick disease type C. In: *Journal of inherited metabolic disease* 36 (1), S. 129–137. DOI: 10.1007/s10545-012-9479-9.

Cho, J. Y.; Min, N.; Franzen, L.; Baker, H. (1996): Rapid down-regulation of tyrosine hydroxylase expression in the olfactory bulb of naris-occluded adult rats. In: *The Journal of comparative neurology* 369 (2), S. 264–276. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960527)369:2<264::AID-CNE7>3.0.CO;2-1.

Christie, Jason M.; Bark, Christine; Hormuzdi, Sheriar G.; Helbig, Ingo; Monyer, Hannah; Westbrook, Gary L. (2005): Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. In: *Neuron* 46 (5), S. 761–772. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.030.

Cluzeau, C. V. M.; Watkins-Chow, D. E.; Fu, R.; Borate, B.; Yanjanin, N.; Dail, M. K. et al. (2012): Microarray expression analysis and identification of serum biomarkers for Niemann-Pick disease, type C1. In: *Human Molecular Genetics* 21 (16), S. 3632–3646. DOI: 10.1093/hmg/ddc193.

Crocker, A. C.; Farber, S. (1958): Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. In: *Medicine* 37 (1), S. 1–95. DOI: 10.1097/00005792-195802000-00001.

Croy, Ilona; Nordin, Steven; Hummel, Thomas (2014): Olfactory disorders and quality of life--an updated review. In: *Chemical senses* 39 (3), S. 185–194. DOI: 10.1093/chemse/bjt072.

Crumling, Mark A.; Liu, Liqian; Thomas, Paul V.; Benson, Jennifer; Kanicki, Ariane; Kabara, Lisa et al. (2012): Hearing loss and hair cell death in mice given the cholesterol-chelating agent hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. In: *PLoS ONE* 7 (12), e53280. DOI: 10.1371/journal.pone.0053280.

Davidson, Cristin D.; Ali, Nafeeza F.; Micsenyi, Matthew C.; Stephney, Gloria; Renault, Sophie; Dobrenis, Kostantin et al. (2009): Chronic Cyclodextrin Treatment of Murine Niemann-Pick C Disease Ameliorates Neuronal Cholesterol and Glycosphingolipid Storage and Disease Progression. In: *PLoS ONE* 4 (9), S. e6951. DOI: 10.1371/journal.pone.0006951.

Dayer, Alexandre G.; Ford, Abigail A.; Cleaver, Kathryn M.; Yassaee, Mina; Cameron, Heather A. (2003): Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. In: *J. Comp. Neurol.* 460 (4), S. 563–572. DOI: 10.1002/cne.10675.

DeHamer, M. K.; Guevara, J. L.; Hannon, K.; Olwin, B. B.; Calof, A. L. (1994): Genesis of olfactory receptor neurons in vitro: regulation of progenitor cell divisions by fibroblast growth factors. In: *Neuron* 13 (5), S. 1083–1097. DOI: 10.1016/0896-6273(94)90047-7.

Devanand, D. P.; Lee, S.; Manly, J.; Andrews, H.; Schupf, N.; Doty, R. L. et al. (2015): Olfactory deficits predict cognitive decline and Alzheimer dementia in an urban community. In: *Neurology* 84 (2), S. 182–189. DOI: 10.1212/WNL.0000000000001132.

Devor, M. (1976): Neuroplasticity in the rearrangement of olfactory tract fibers after neonatal transection in hamsters. In: *J. Comp. Neurol.* 166 (1), S. 49–72. DOI: 10.1002/cne.901660105.

Dixit, Sayali S.; Jadot, Michel; Sohar, Istvan; Sleat, David E.; Stock, Ann M.; Lobel, Peter (2011): Loss of Niemann-Pick C1 or C2 protein results in similar biochemical changes suggesting that these proteins function in a common lysosomal pathway. In: *PLoS ONE* 6 (8), e23677. DOI: 10.1371/journal.pone.0023677.

Djordjevic, J.; Jones-Gotman, M.; Sousa, K. de; Chertkow, H. (2008): Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. In: *Neurobiology of aging* 29 (5), S. 693–706. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.014.

Doetsch, F.; García-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. (1997): Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. In: *Journal of Neuroscience* 17 (13), S. 5046–5061.

Doetsch, Fiona (2003): The glial identity of neural stem cells. In: *Nat. Neurosci.* 6 (11), S. 1127–1134. DOI: 10.1038/nn1144.

Doty, Richard L. (2012): Olfactory dysfunction in Parkinson disease. In: *Nature reviews. Neurology* 8 (6), S. 329–339. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.80.

Dover, R.; Patel, K. (1994): Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. In: *Histochemistry* 102 (5), S. 383–387. DOI: 10.1007/BF00268909.

Elleder, M.; Jirasek, A.; Smid, F.; Ledvinova, J.; Besley, G. T. (1985): Niemann-Pick disease type C. Study on the nature of the cerebral storage process. In: *Acta neuropathologica* 66 (4), S. 325–336.

Elleder, M.; Smíd, F.; Hyniová, H.; Cihula, J.; Zeman, J.; Macek, M. (1984): Liver findings in Niemann-Pick disease type C. In: *The Histochemical journal* 16 (11), S. 1147–1170. DOI: 10.1007/bf01003441.

Erickson, Robert P.; Bhattacharyya, Achyut; Hunter, Robert J.; Heidenreich, Randall A.; Cherrington, Nathan J. (2005): Liver disease with altered bile acid transport in Niemann-Pick C mice on a high-fat, 1% cholesterol diet. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 289 (2), G300–7. DOI: 10.1152/ajpgi.00568.2004.

Farbman, Albert I. (1990): Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? In: *Trends in Neurosciences* 13 (9), S. 362–365. DOI: 10.1016/0166-2236(90)90017-5.

Farmer, Cristan A.; Thurm, Audrey; Farhat, Nicole; Bianconi, Simona; Keener, Lee Ann; Porter, Forbes D. (2019): Long-Term Neuropsychological Outcomes from an Open-Label Phase I/IIa Trial of 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrins (VTS-270) in Niemann-Pick Disease, Type C1. In: *CNS drugs* 33 (7), S. 677–683. DOI: 10.1007/s40263-019-00642-2.

García-Robles, Ana Alejandra; Company-Albir, María José; Megías-Vericat, Juan Eduardo; Fernández-Megía, María José; Pérez-Miralles, Francisco Carlos; López-Briz, Eduardo et al. (2016): Use of 2 hydroxypropyl-beta-cyclodextrin therapy in two adult Niemann Pick Type C patients. In: *Journal of the Neurological Sciences* 366, S. 65–67. DOI: 10.1016/j.jns.2016.04.048.

Garver, William S.; Francis, Gordon A.; Jelinek, David; Shepherd, Glen; Flynn, James; Castro, Graciela et al. (2007): The National Niemann-Pick C1 disease database: report of clinical features and health problems. In: *American journal of medical genetics. Part A* 143A (11), S. 1204–1211. DOI: 10.1002/ajmg.a.31735.

German, D. C.; Liang, C-L; Song, T.; Yazdani, U.; Xie, C.; Dietschy, J. M. (2002): Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: glial involvement. In: *Neuroscience* 109 (3), S. 437–450.

German, D. C.; Quintero, E. M.; Liang, C. L.; Ng, B.; Punia, S.; Xie, C.; Dietschy, J. M. (2001): Selective neurodegeneration, without neurofibrillary tangles, in a mouse model of Niemann-Pick C disease. In: *The Journal of comparative neurology* 433 (3), S. 415–425.

Getchell, T. V.; Margolis, F. L.; Getchell, M. L. (1984): Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. In: *Progress in Neurobiology* 23 (4), S. 317–345.

Ginocchio, Virginia Maria; D'Amico, Adele; Bertini, Enrico; Ceravolo, Ferdinando; Dardis, Andrea; Verrigni, Daniela et al. (2013): Efficacy of miglustat in Niemann-Pick C disease: a single centre experience. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 110 (3), S. 329–335. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.07.019.

Ginsberg, S. D.; Hemby, S. E.; Lee, V. M.; Eberwine, J. H.; Trojanowski, J. Q. (2000): Expression profile of transcripts in Alzheimer's disease tangle-bearing CA1 neurons. In: *Annals of neurology* 48 (1), S. 77–87.

Goldstein, B. J.; Schwob, J. E. (1996): Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. In: *Journal of Neuroscience* 16 (12), S. 4005–4016.

Goodrum, J. F.; Pentchev, P. G. (1997): Cholesterol reutilization during myelination of regenerating PNS axons is impaired in Niemann-Pick disease type C mice. In: *Journal of neuroscience research* 49 (3), S. 389–392.

Gordon, M. K.; Mumm, J. S.; Davis, R. A.; Holcomb, J. D.; Calof, A. L. (1995): Dynamics of MASH1 expression in vitro and in vivo suggest a non-stem cell site of MASH1 action in the olfactory receptor neuron lineage. In: *Molecular and cellular neurosciences* 6 (4), S. 363–379. DOI: 10.1006/mcne.1995.1028.

Graziadei, P. P.; Graziadei, G. A. (1979): Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. In: *Journal of neurocytology* 8 (1), S. 1–18.

Greer, C. A. (1987): Golgi analyses of dendritic organization among denervated olfactory bulb granule cells. In: *J. Comp. Neurol.* 257 (3), S. 442–452. DOI: 10.1002/cne.902570311.

Greer, W. L.; Riddell, D. C.; Gillan, T. L.; Girouard, G. S.; Sparrow, S. M.; Byers, D. M. et al. (1998): The Nova Scotia (type D) form of Niemann-Pick disease is caused by a G3097--T

transversion in NPC1. In: *The American Journal of Human Genetics* 63 (1), S. 52–54. DOI: 10.1086/301931.

Griffin, Lisa D.; Gong, Wenhui; Verot, Lucie; Mellon, Synthia H. (2004): Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. In: *Nature medicine* 10 (7), S. 704–711. DOI: 10.1038/nm1073.

Hawkes, C. H.; Shephard, B. C.; Daniel, S. E. (1997): Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 62 (5), S. 436–446. DOI: 10.1136/jnnp.62.5.436.

Higashi, Y.; Murayama, S.; Pentchev, P. G.; Suzuki, K. (1993): Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse. In: *Acta neuropathologica* 85 (2), S. 175–184.

Hinds, J. W.; Hinds, P. L.; McNelly, N. A. (1984): An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium: evidence for long-lived receptors. In: *The Anatomical record* 210 (2), S. 375–383. DOI: 10.1002/ar.1092100213.

Hipler, U. C.; Schonfelder, U.; Hipler, C.; Elsner, P. (2007): Influence of cyclodextrins on the proliferation of HaCaT keratinocytes in vitro. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 83 (1), S. 70–79. DOI: 10.1002/jbm.a.31195.

Holl, Anna-Maria (2018): Survival of mature mouse olfactory sensory neurons labeled genetically perinatally. In: *Molecular and cellular neurosciences* 88, S. 258–269. DOI: 10.1016/j.mcn.2018.02.005.

Hovakimyan, M.; Maass, F.; Petersen, J.; Holzmann, C.; Witt, M.; Lukas, J. et al. (2013a): Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann-Pick Type C1 mice. In: *Neuroscience* 252, S. 201–211. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.001.

Hovakimyan, Marina; Meyer, Anja; Lukas, Jan; Luo, Jiankai; Gudziol, Volker; Hummel, Thomas et al. (2013b): Olfactory Deficits in Niemann-Pick Type C1 (NPC1) Disease. In: *PLoS ONE* 8 (12), S. e82216. DOI: 10.1371/journal.pone.0082216.

Hovakimyan, Marine; Petersen, Jana; Maass, Fabian; Reichard, Maria; Witt, Martin; Lukas, Jan et al. (2011): Corneal Alterations during Combined Therapy with Cyclodextrin/Allopregnanolone and Miglustat in a Knock-Out Mouse Model of NPC1 Disease. In: *PLoS ONE* 6 (12), S. e28418. DOI: 10.1371/journal.pone.0028418.

Howe, Vicky; Sharpe, Laura J.; Alexopoulos, Stephanie J.; Kunze, Sarah V.; Chua, Ngee Kiat; Li, Dianfan; Brown, Andrew J. (2016): Cholesterol homeostasis: How do cells sense sterol excess? In: *Chemistry and physics of lipids* 199, S. 170–178. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2016.02.011.

Huard, Josee M.T.; Youngentob, Steven L.; Goldstein, Bradley J.; Luskin, Marla B.; Schwob, James E. (1998): Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. In: *Journal of Comparative Neurology* 400. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981102)400:4<469::AID-CNE3>3.0.CO;2-8.

Hummel, T.; Witt, M.; Reichmann, H.; Welge-Luessen, A.; Haehner, A. (2010): Immunohistochemical, volumetric, and functional neuroimaging studies in patients with idiopathic Parkinson's disease. In: *Journal of the Neurological Sciences* 289 (1-2), S. 119–122. DOI: 10.1016/j.jns.2009.08.026.

Imamura, Fumiaki; Nagao, Hiroshi; Naritsuka, Hiromi; Murata, Yasunobu; Taniguchi, Hisaaki; Mori, Kensaku (2006): A leucine-rich repeat membrane protein, 5T4, is expressed by a subtype of granule cells with dendritic arbors in specific strata of the mouse olfactory bulb. In: *J. Comp. Neurol.* 495 (6), S. 754–768. DOI: 10.1002/cne.20896.

Irwin, Ronald W.; Brinton, Roberta Diaz (2014): Allopregnanolone as regenerative therapeutic for Alzheimer's disease. Translational development and clinical promise. In: *Progress in Neurobiology* 113, S. 40–55. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.08.004.

Iwai, Naomi; Zhou, Zhijian; Roop, Dennis R.; Behringer, Richard R. (2008): Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (5), S. 1298–1306. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0891.

Jankovski, A.; Sotelo, C. (1996): Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. In: *J. Comp. Neurol.* 371 (3), S. 376–396. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960729)371:3<376::AID-CNE3>3.0.CO;2-#.

Johnston, Graham A. R.; Chebib, Mary; Hanrahan, Jane R.; Mewett, Kenneth N. (2010): Neurochemicals for the investigation of GABA(C) receptors. In: *Neurochemical research* 35 (12), S. 1970–1977. DOI: 10.1007/s11064-010-0271-7.

Jonakait, G. M.; Luskin, M. B.; Wei, R.; Tian, X. F.; Ni, L. (1996): Conditioned medium from activated microglia promotes cholinergic differentiation in the basal forebrain in vitro. In: *Developmental biology* 177 (1), S. 85–95. DOI: 10.1006/dbio.1996.0147.

Karpa, Michael J.; Gopinath, Bamini; Rochtchina, Elena; Wang, Jie Jin; Cumming, Robert G.; Sue, Carolyn M.; Mitchell, Paul (2010): Prevalence and Neurodegenerative or Other Associations With Olfactory Impairment in an Older Community. In: *J Aging Health* 22 (2), S. 154–168. DOI: 10.1177/0898264309353066.

Kawagishi, K.; Ando, M.; Yokouchi, K.; Sumitomo, N.; Karasawa, M.; Fukushima, N.; Moriizumi, T. (2014a): Stereological quantification of olfactory receptor neurons in mice. In: *Neuroscience* 272, S. 29–33. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.050.

Kawagishi, K.; Ando, M.; Yokouchi, K.; Sumitomo, N.; Karasawa, M.; Fukushima, N.; Moriizumi, T. (2014b): Stereological quantification of olfactory receptor neurons in mice. In: *Neuroscience* 272, S. 29–33. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.050.

Khankan, Rana R.; Griffis, Khrist G.; Haggerty-Skeans, James R.; Zhong, Hui; Roy, Roland R.; Edgerton, V. Reggie; Phelps, Patricia E. (2016): Olfactory Ensheathing Cell Transplantation after a Complete Spinal Cord Transection Mediates Neuroprotective and Immunomodulatory Mechanisms to Facilitate Regeneration. In: *J. Neurosci.* 36 (23), S. 6269–6286. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0085-16.2016.

Kosaka, Katsuko; Toida, Kazunori; Aika, Yusuke; Kosaka, Toshio (1998): How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. In: *Neuroscience Research* 30 (2), S. 101–110. DOI: 10.1016/S0168-0102(98)00002-9.

Kosaka, Toshio; Kosaka, Katsuko (2005): Structural organization of the glomerulus in the main olfactory bulb. In: *Chemical senses* 30 Suppl 1, i107-8. DOI: 10.1093/chemse/bjh137.

Kosaka, Toshio; Kosaka, Katsuko (2010): Heterogeneity of calbindin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb: I. General description. In: *Neuroscience Research* 67 (4), S. 275–292. DOI: 10.1016/j.neures.2010.04.009.

Lambert, Jeremy J.; Belelli, Delia; Peden, Dianne R.; Vardy, Audrey W.; Peters, John A. (2003): Neurosteroid modulation of GABAA receptors. In: *Progress in Neurobiology* 71 (1), S. 67–80.

Lazic, Stanley E.; Goodman, Anna O. G.; Grote, Helen E.; Blakemore, Colin; Morton, A. Jennifer; Hannan, Anthony J. et al. (2007): Olfactory abnormalities in Huntington's disease: decreased plasticity in the primary olfactory cortex of R6/1 transgenic mice and reduced olfactory discrimination in patients. In: *Brain Research* 1151, S. 219–226. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.03.018.

Lehmkuhl, Andrew M.; Dirr, Emily R.; Fleming, Sheila M. (2014): Olfactory assays for mouse models of neurodegenerative disease. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (90), e51804. DOI: 10.3791/51804.

Lengyel, D.; Weissert, M.; Schmid, L.; Gottlob, I. (1999): Augenbewegungsstörungen als Kennzeichen für die Diagnose des Morbus Niemann-Pick Typ C bei zwei Schwestern. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 214 (1), S. 50–52. DOI: 10.1055/s-2008-1034748.

Leung, Cheuk T.; Coulombe, Pierre A.; Reed, Randall R. (2007): Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. In: *Nat. Neurosci.* 10 (6), S. 720–726. DOI: 10.1038/nn1882.

Liao, Guanghong; Yao, Yueqin; Liu, Jihua; Yu, Zhang; Cheung, Simon; Xie, Ang et al. (2007): Cholesterol Accumulation Is Associated with Lysosomal Dysfunction and Autophagic Stress in Npc1^{-/-} Mouse Brain. In: *The American Journal of Pathology* 171 (3), S. 962–975. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070052.

Liu, Benny; Ramirez, Charina M.; Miller, Anna M.; Repa, Joyce J.; Turley, Stephen D.; Dietschy, John M. (2010): Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. In: *Journal of lipid research* 51 (5), S. 933–944. DOI: 10.1194/jlr.M000257.

Liu, Benny; Turley, Stephen D.; Burns, Dennis K.; Miller, Anna M.; Repa, Joyce J.; Dietschy, John M. (2009): Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1^{-/-} mouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (7), S. 2377–2382. DOI: 10.1073/pnas.0810895106.

Liu, F. T.; Hsu, D. K.; Zuberi, R. I.; Kuwabara, I.; Chi, E. Y.; Henderson, W. R. (1995): Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. In: *The American Journal of Pathology* 147 (4), S. 1016–1028.

Lledo, Pierre-Marie; Alonso, Mariana; Grubb, Matthew S. (2006): Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. In: *Nature reviews. Neuroscience* 7 (3), S. 179–193. DOI: 10.1038/nrn1867.

Lledo, Pierre-Marie; Valley, Matt (2016): Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a018945.

Loftus, S. K.; Morris, J. A.; Carstea, E. D.; Gu, J. Z.; Cummings, C.; Brown, A. et al. (1997): Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5323), S. 232–235. DOI: 10.1126/science.277.5323.232.

Lois, C.; Alvarez-Buylla, A. (1994): Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5162), S. 1145–1148. DOI: 10.1126/science.8178174.

Loo, Alice T.; Youngentob, Steven L.; Kent, Paul F.; Schwob, James E. (1996): The aging olfactory epithelium. Neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity. In: *International Journal of Developmental Neuroscience* 14 (7-8), S. 881–900. DOI: 10.1016/S0736-5748(96)00046-9.

Love, S.; Bridges, L. R.; Case, C. P. (1995): Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. In: *Brain : a journal of neurology* 118 (Pt 1), S. 119–129. DOI: 10.1093/brain/118.1.119.

Lyseng-Williamson, Katherine A. (2014): Miglustat: a review of its use in Niemann-Pick disease type C. In: *Drugs* 74 (1), S. 61–74. DOI: 10.1007/s40265-013-0164-6.

Maarup, Timothy J.; Chen, Agnes H.; Porter, Forbes D.; Farhat, Nicole Y.; Ory, Daniel S.; Sidhu, Rohini et al. (2015): Intrathecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in a single patient with Niemann-Pick C1. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 116 (1-2), S. 75–79. DOI: 10.1016/j.ymgme.2015.07.001.

Maass, Fabian; Petersen, Jana; Hovakimyan, Marina; Schmitt, Oliver; Witt, Martin; Hawlitschka, Alexander et al. (2015): Reduced cerebellar neurodegeneration after combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat in NPC1: a mouse model of Niemann-Pick type C1 disease. In: *Journal of neuroscience research* 93 (3), S. 433–442. DOI: 10.1002/jnr.23509.

Mackay-Sim, A.; Kittel, P. W. (1991): On the Life Span of Olfactory Receptor Neurons. In: *The European journal of neuroscience* 3 (3), S. 209–215.

Mackay-Sim, Alan; John, James St; Schwob, James E. (2015): Neurogenesis in the Adult Olfactory Epithelium. In: Richard L. Doty (Hg.): *Handbook of Olfaction and Gustation*, Bd. 82. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, S. 133–156.

Macrides, F.; Schneider, S. P. (1982): Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. In: *J. Comp. Neurol.* 208 (4), S. 419–430. DOI: 10.1002/cne.902080410.

Margolis, F. L. (1982): Olfactory Marker Protein (OMP). In: *Scandinavian Journal of Immunology* 15, S. 181–199. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1982.tb03764.x.

Matsuo, Muneaki; Togawa, Masami; Hirabaru, Keiko; Mochinaga, Sakiko; Narita, Aya; Adachi, Masao et al. (2013): Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann–Pick Type C disease. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 108 (1), S. 76–81. DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.11.005.

Maue, Robert A.; Burgess, Robert W.; Wang, Bing; Wooley, Christine M.; Seburn, Kevin L.; Vanier, Marie T. et al. (2012): A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. In: *Human Molecular Genetics* 21 (4), S. 730–750. DOI: 10.1093/hmg/ddr505.

Mazzoni, I. E.; Kenigsberg, R. L. (1997): Microglia from the developing rat medial septal area can affect cholinergic and GABAergic neuronal differentiation in vitro. In: *Neuroscience* 76 (1), S. 147–157.

Megias-Vericat, Juan Eduardo; Garcia-Robles, Ana; Company-Albir, Maria Jose; Fernandez-Megia, Maria Jose; Perez-Miralles, Francisco Carlos; Lopez-Briz, Eduardo et al. (2017): Early experience with compassionate use of 2 hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for Niemann-Pick type C disease: review of initial published cases. In: *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. DOI: 10.1007/s10072-017-2833-9.

Mermelstein, Claudia S.; Portilho, Debora M.; Medeiros, Rommel B.; Matos, Aline R.; Einicker-Lamas, Marcelo; Tortelote, Giovane G. et al. (2005): Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei. In: *Cell and tissue research* 319 (2), S. 289–297. DOI: 10.1007/s00441-004-1004-5.

Meshulam, R. I.; Moberg, P. J.; Mahr, R. N.; Doty, R. L. (1998): Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. In: *Archives of neurology* 55 (1), S. 84–90.

Meyer, Anja; Gläser, Anne; Bräuer, Anja U.; Wree, Andreas; Strotmann, Jörg; Rolfs, Arndt; Witt, Martin (2018): Olfactory Performance as an Indicator for Protective Treatment Effects in an Animal Model of Neurodegeneration. In: *Frontiers in integrative neuroscience* 12, S. 35. DOI: 10.3389/fnint.2018.00035.

Meyer, Anja; Wree, Andreas; Gunther, Rene; Holzmann, Carsten; Schmitt, Oliver; Rolfs, Arndt; Witt, Martin (2017): Increased Regenerative Capacity of the Olfactory Epithelium in Niemann-Pick Disease Type C1. In: *International journal of molecular sciences* 18 (4). DOI: 10.3390/ijms18040777.

- Moberg, P. J.; Pearlson, G. D.; Speedie, L. J.; Lipsey, JR; Strauss, M. E.; Folstein, S. E. (1987): Olfactory recognition: differential impairments in early and late Huntington's and Alzheimer's diseases. In: *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 9 (6), S. 650–664. DOI: 10.1080/01688638708405208.
- Mombaerts, Peter (2006): Axonal wiring in the mouse olfactory system. In: *Annual review of cell and developmental biology* 22, S. 713–737. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093915.
- Monnaert, V.; Tilloy, S.; Bricout, H.; Fenart, L.; Cecchelli, R.; Monflier, E. (2004): Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 310 (2), S. 745–751. DOI: 10.1124/jpet.104.067512.
- Morgan, Sarah C.; Taylor, Deanna L.; Pocock, Jennifer M. (2004): Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. In: *Journal of Neurochemistry* 90 (1), S. 89–101. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02461.x.
- Mori, K.; Kishi, K.; Ojima, H. (1983): Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. In: *J. Comp. Neurol.* 219 (3), S. 339–355. DOI: 10.1002/cne.902190308.
- Moulton, David G. (1974): DYNAMICS OF CELL POPULATIONS IN THE OLFACTORY EPITHELIUM. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 237. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb49843.x.
- Munkacsi, Andrew B.; Chen, Fannie W.; Brinkman, Matthew A.; Higaki, Katsumi; Gutiérrez, Giselle Domínguez; Chaudhari, Jagruti et al. (2011): An "exacerbate-reverse" strategy in yeast identifies histone deacetylase inhibition as a correction for cholesterol and sphingolipid transport defects in human Niemann-Pick type C disease. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (27), S. 23842–23851. DOI: 10.1074/jbc.M111.227645.
- Nadi, N. S.; Head, R.; Grillo, M.; Hempstead, J.; Grannot-Reisfeld, N.; Margolis, F. L. (1981): Chemical deafferentation of the olfactory bulb: plasticity of the levels of tyrosine hydroxylase, dopamine and norepinephrine. In: *Brain Research* 213 (2), S. 365–377.
- Nagata, K.; Takei, N.; Nakajima, K.; Saito, H.; Kohsaka, S. (1993): Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. In: *Journal of neuroscience research* 34 (3), S. 357–363. DOI: 10.1002/jnr.490340313.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database: 2-HP β CD, CID=90479739. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/90479739> (accessed on Sept. 7, 2019).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database: Miglustat, CID=51634. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Miglustat#datasheet=LCSS> (accessed on Sept. 7, 2019).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database.: Pregnanolone, CID=31402. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pregnanolone> (accessed on Sept. 7, 2019).
- Naureckiene, S.; Sleat, D. E.; Lackland, H.; Fensom, A.; Vanier, M. T.; Wattiaux, R. et al. (2000): Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. In: *Science (New York, N.Y.)* 290 (5500), S. 2298–2301. DOI: 10.1126/science.290.5500.2298.
- Neefjes, Jacques; van der Kant, Rik (2014): Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system. In: *Trends in Neurosciences* 37 (2), S. 66–76. DOI: 10.1016/j.tins.2013.11.006.
- Neufeld, E. B.; Wastney, M.; Patel, S.; Suresh, S.; Cooney, A. M.; Dwyer, N. K. et al. (1999): The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of

multiple lysosomal cargo. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (14), S. 9627–9635. DOI: 10.1074/jbc.274.14.9627.

Nunes, Maria João; Moutinho, Miguel; Gama, Maria João; Rodrigues, Cecília M. P.; Rodrigues, Elsa (2013): Histone deacetylase inhibition decreases cholesterol levels in neuronal cells by modulating key genes in cholesterol synthesis, uptake and efflux. In: *PLoS ONE* 8 (1), e53394. DOI: 10.1371/journal.pone.0053394.

Ohta, Y.; Ichimura, K. (2000): Proliferation Markers, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Ki67, 5-Bromo-2'-Deoxyuridine, and Cyclin D1 in Mouse Olfactory Epithelium. In: *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 109 (11), S. 1046–1048. DOI: 10.1177/000348940010901110.

Onda, Kiyoshi; Davis, Richard L.; Shibuya, Makoto; Wilson, Charles B.; Hoshino, Takao (1994): Correlation between the bromodeoxyuridine labeling index and the MIB-1 and Ki-67 proliferating cell indices in cerebral gliomas. In: *Cancer* 74 (7), S. 1921–1926. DOI: 10.1002/1097-0142(19941001)74:7<1921::AID-CNCR2820740716>3.0.CO;2-9.

Orona, E.; Rainer, E. C.; Scott, J. W. (1984): Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. In: *J. Comp. Neurol.* 226 (3), S. 346–356. DOI: 10.1002/cne.902260305.

Ory, Daniel S.; Ottinger, Elizabeth A.; Farhat, Nicole Yanjanin; King, Kelly A.; Jiang, Xuntian; Weissfeld, Lisa et al. (2017): Intrathecal 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1–2 trial. In: *The Lancet* 390 (10104), S. 1758–1768. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31465-4.

Patterson, M. C.; Vanier, M. T.; Suzuki, K.; Morris, J. a, Carstea, E., Neufeld, E. B., Blanchette-Mackie, Pentchev, P. G. (2000): PART 16: LYSOSOMAL DISORDERS Chapter 145: Niemann-Pick Disease Type C: A Lipid Trafficking Disorder. In: *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, S. 1–44.

Patterson, Marc C.; Hendriksz, Christian J.; Walterfang, Mark; Sedel, Frederic; Vanier, Marie T.; Wijburg, Frits (2012): Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 106 (3), S. 330–344. DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.03.012.

Patterson, Marc C.; Vecchio, Darleen; Prady, Helena; Abel, Larry; Wraith, James E. (2007): Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. In: *The Lancet Neurology* 6 (9), S. 765–772. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70194-1.

Peake, Kyle B.; Vance, Jean E. (2010): Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. In: *FEBS letters* 584 (13), S. 2731–2739. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.04.047.

Pelosi, Paolo; Mastrogiacomo, Rosa; Iovinella, Immacolata; Tuccori, Elena; Persaud, Krishna C. (2014): Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. In: *Applied microbiology and biotechnology* 98 (1), S. 61–70. DOI: 10.1007/s00253-013-5383-y.

Pentchev, P. G.; Comly, M. E.; Kruth, H. S.; Vanier, M. T.; Wenger, D. A.; Patel, S.; Brady, R. O. (1985): A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (23), S. 8247–8251. DOI: 10.1073/pnas.82.23.8247.

Pentchev, P. G.; Gal, A. E.; Booth, A. D.; Omodeo-Sale, F.; Fours, J.; Neumeyer, B. A. et al. (1980): A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 619 (3), S. 669–679. DOI: 10.1016/0005-2760(80)90116-2.

Petreanu, Leopoldo; Alvarez-Buylla, Arturo (2002): Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. In: *J. Neurosci.* 22 (14), S. 6106–6113.

- Philippart, M.; Engel, J.; Zimmerman, E. G. (1983): Gelastic cataplexy in Niemann-Pick disease group C and related variants without generalized sphingomyelinase deficiency. In: *Ann Neurol.* 14 (4), S. 492–493. DOI: 10.1002/ana.410140418.
- Pineda, M.; Wraith, J. E.; Mengel, E.; Sedel, F.; Hwu, W-L; Rohrbach, M. et al. (2009): Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 98 (3), S. 243–249. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.07.003.
- Pipalia, Nina H.; Cosner, Casey C.; Huang, Amy; Chatterjee, Anamitra; Bourbon, Pauline; Farley, Nathan et al. (2011): Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts. In: *PNAS* 108 (14), S. 5620–5625. DOI: 10.1073/pnas.1014890108.
- Pixley, S. K. (1992): CNS glial cells support in vitro survival, division, and differentiation of dissociated olfactory neuronal progenitor cells. In: *Neuron* 8 (6), S. 1191–1204. DOI: 10.1016/0896-6273(92)90139-5.
- Platt, F. M.; Neises, G. R.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. (1994): N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (11), S. 8362–8365.
- Platt, Frances M.; Jeyakumar, Mylvaganam (2008): Substrate reduction therapy. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 97 (457), S. 88–93. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2008.00656.x.
- Porter, Forbes D.; Scherrer, David E.; Lanier, Michael H.; Langmade, S. Joshua; Molugu, Vasumathi; Gale, Sarah E. et al. (2010): Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. In: *Science translational medicine* 2 (56), 56ra81. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001417.
- Price, J. L.; Powell, T. P. (1970): The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. In: *Journal of cell science* 7 (3), S. 631–651.
- Qian, Xiaowei; Cao, Hong; Ma, Qian; Wang, Qinsai; He, Wei; Qin, Peishun et al. (2015): Allopregnanolone attenuates A β 25-35-induced neurotoxicity in PC12 cells by reducing oxidative stress. In: *International journal of clinical and experimental medicine* 8 (8), S. 13610–13615.
- Ramirez, Charina M.; Liu, Benny; Taylor, Anna M.; Repa, Joyce J.; Burns, Dennis K.; Weinberg, Arthur G. et al. (2010): Weekly cyclodextrin administration normalizes cholesterol metabolism in nearly every organ of the Niemann-Pick type C1 mouse and markedly prolongs life. In: *Pediatric research* 68 (4), S. 309–315. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3181ee4dd2.
- Reddy, Doodipala Samba (2003): Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. In: *Critical reviews in neurobiology* 15 (3-4), S. 197–234.
- Reddy, Doodipala Samba (2010): Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. In: *Progress in brain research* 186, S. 113–137. DOI: 10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7.
- Regensburger, Martin; Kohl, Zacharias; Grundmann, Kathrin; Winner, Beate; Riess, Olaf; Winkler, Jurgen (2009): Adult neural precursor cells unaffected in animal models of DYT1 dystonia. In: *Neuroreport* 20 (17), S. 1529–1533. DOI: 10.1097/WNR.0b013e328331c761.
- Ross, G. W.; Petrovitch, H.; Abbott, R. D.; Tanner, C. M.; Popper, J.; Masaki, K. et al. (2008): Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. In: *Annals of neurology* 63 (2), S. 167–173. DOI: 10.1002/ana.21291.
- Sarna, Justyna R.; Larouche, Matt; Marzban, Hassan; Sillitoe, Roy V.; Rancourt, Derrick E.; Hawkes, Richard (2003): Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. In: *J. Comp. Neurol.* 456 (3), S. 279–291. DOI: 10.1002/cne.10522.

- Schlegel, Victoria; Thieme, Markus; Holzmann, Carsten; Witt, Martin; Grittner, Ulrike; Rolfs, Arndt; Wree, Andreas (2016): Pharmacologic Treatment Assigned for Niemann Pick Type C1 Disease Partly Changes Behavioral Traits in Wild-Type Mice. In: *International journal of molecular sciences* 17 (11). DOI: 10.3390/ijms17111866.
- Scholzen, T.; Gerdes, J. (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. In: *Journal of cellular physiology* 182 (3), S. 311–322. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
- Schwob, James E. (2002): Neural regeneration and the peripheral olfactory system. In: *Anat. Rec.* 269 (1), S. 33–49. DOI: 10.1002/ar.10047.
- Seo, Yoojin; Kim, Hyung-Sik; Kang, Insung; Choi, Soon Won; Shin, Tae-Hoon; Shin, Ji-Hee et al. (2016): Cathepsin S contributes to microglia-mediated olfactory dysfunction through the regulation of Cx3cl1-Cx3cr1 axis in a Niemann-Pick disease type C1 model. In: *Glia* 64 (12), S. 2291–2305. DOI: 10.1002/glia.23077.
- Seo, Yoojin; Kim, Hyung-Sik; Shin, Yooyoung; Kang, Insung; Choi, Soon Won; Yu, Kyung-Rok et al. (2014): Excessive microglial activation aggravates olfactory dysfunction by impeding the survival of newborn neurons in the olfactory bulb of Niemann-Pick disease type C1 mice. In: *Biochimica et biophysica acta* 1842 (11), S. 2193–2203. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.08.005.
- Sequerra, Eduardo B. (2014): Subventricular zone progenitors in time and space: generating neuronal diversity. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 8, S. 434. DOI: 10.3389/fncel.2014.00434.
- Shepherd, G. M. (1972): Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. In: *Physiological reviews* 52 (4), S. 864–917. DOI: 10.1152/physrev.1972.52.4.864.
- Shi, Xingxing; Li, Wenjing; Liu, Honghong; Yin, Deling; Zhao, Jing (2017): beta-Cyclodextrin induces the differentiation of resident cardiac stem cells to cardiomyocytes through autophagy. In: *Biochimica et biophysica acta* 1864 (8), S. 1425–1434. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.012.
- Shipley, Michael T.; Ennis, Matthew (1996): Functional organization of olfactory system. In: *J. Neurobiol.* 30 (1), S. 123–176. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:1%3C123::AID-NEU11%3E3.0.CO;2-N.
- Shipley, Michael T.; Ennis, Matthew; Puche, Adam C. (2004): Olfactory System. In: *The Rat Nervous System*: Elsevier, S. 923–964.
- Simons, K.; Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. In: *Nature* 387 (6633), S. 569–572. DOI: 10.1038/42408.
- Singh, Chanpreet; Liu, Lifei; Wang, Jun Ming; Irwin, Ronald W.; Yao, Jia; Chen, Shuhua et al. (2012): Allopregnanolone restores hippocampal-dependent learning and memory and neural progenitor survival in aging 3xTgAD and nonTg mice. In: *Neurobiology of aging* 33 (8), S. 1493–1506. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.008.
- Sleat, David E.; Wiseman, Jennifer A.; El-Banna, Mukarram; Price, Sandy M.; Verot, Lucie; Shen, Michael M. et al. (2004): Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16), S. 5886–5891. DOI: 10.1073/pnas.0308456101.
- Sokol, J.; Blanchette-Mackie, J.; Kruth, H. S.; Dwyer, N. K.; Amende, L. M.; Butler, J. D. et al. (1988): Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. In: *Journal of Biological Chemistry* 263 (7), S. 3411–3417.
- Solomon, David; Winkelman, A. Charles; Zee, David S.; Gray, Lawrence; Büttner-Ennever, Jean (2005): Niemann-Pick type C disease in two affected sisters: ocular motor recordings and brain-

stem neuropathology. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1039, S. 436–445. DOI: 10.1196/annals.1325.041.

Spiegel, Ronen; Raas-Rothschild, Annick; Reish, Orit; Regev, Miriam; Meiner, Vardiella; Bargal, Ruth et al. (2009): The clinical spectrum of fetal Niemann-Pick type C. In: *American journal of medical genetics. Part A* 149A (3), S. 446–450. DOI: 10.1002/ajmg.a.32642.

Stone, D. M.; Wessel, T.; Joh, T. H.; Baker, H. (1990): Decrease in tyrosine hydroxylase, but not aromatic L-amino acid decarboxylase, messenger RNA in rat olfactory bulb following neonatal, unilateral odor deprivation. In: *Brain research. Molecular brain research* 8 (4), S. 291–300.

Storch, Judith; Xu, Zhi (2009): Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. In: *Biochimica et biophysica acta* 1791 (7), S. 671–678. DOI: 10.1016/j.bbalip.2009.02.001.

Sui, Yi; Horne, Malcolm K.; Stanić, Davor; Nait-Oumesmar, Brahim (2012): Reduced Proliferation in the Adult Mouse Subventricular Zone Increases Survival of Olfactory Bulb Interneurons. In: *PLoS ONE* 7 (2), S. e31549. DOI: 10.1371/journal.pone.0031549.

Suzuki, Hiroyoshi; Sakiyama, Takeshi; Harada, Naoko; Abe, Mistubumi; Tadokoro, Mamoru (2003): Pathologic changes of glial cells in murine model of Niemann-Pick disease type C: immunohistochemical, lectin-histochemical and ultrastructural observations. In: *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 45 (1), S. 1–4.

Suzuki, K.; Parker, C. C.; Pentchev, P. G.; Katz, D.; Ghetti, B.; D'Agostino, A. N.; Carstea, E. D. (1995): Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. In: *Acta neuropathologica* 89 (3), S. 227–238. DOI: 10.1007/bf00309338.

Suzuki, Y.; Takeda, M.; Farbman, A. I. (1996): Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bullectomy. In: *J. Comp. Neurol.* 376 (4), S. 509–517. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961223)376:4<509::AID-CNE1>3.0.CO;2-5.

Tanaka, J.; Nakamura, H.; Miyawaki, S. (1988): Cerebellar involvement in murine sphingomyelinosis: a new model of Niemann-Pick disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 47 (3), S. 291–300.

Tanaka, Yuta; Yamada, Yusei; Ishitsuka, Yoichi; Matsuo, Muneaki; Shiraishi, Koki; Wada, Koki et al. (2015): Efficacy of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Niemann–Pick Disease Type C Model Mice and Its Pharmacokinetic Analysis in a Patient with the Disease. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 38 (6), S. 844–851. DOI: 10.1248/bpb.b14-00726.

Taylor, Anna M.; Liu, Bing; Mari, Yelenis; Liu, Benny; Repa, Joyce J. (2012): Cyclodextrin mediates rapid changes in lipid balance in *Npc1*^{-/-} mice without carrying cholesterol through the bloodstream. In: *Journal of lipid research* 53 (11), S. 2331–2342. DOI: 10.1194/jlr.M028241.

te Vruchte, Danielle; Lloyd-Evans, Emyr; Veldman, Robert Jan; Neville, David C. A.; Dwek, Raymond A.; Platt, Frances M. et al. (2004): Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (25), S. 26167–26175. DOI: 10.1074/jbc.M311591200.

Trendelenburg, G.; Vanier, M. T.; Maza, S.; Millat, G.; Bohner, G.; Munz, D. L.; Zschenderlein, R. (2006): Niemann-Pick type C disease in a 68-year-old patient. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 77 (8), S. 997–998. DOI: 10.1136/jnnp.2005.086785.

Vance, J. E.; Karten, B. (2014): Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. In: *The Journal of Lipid Research* 55 (8), S. 1609–1621. DOI: 10.1194/jlr.R047837.

Vanier, M. T.; Millat, G. (2003): Niemann-Pick disease type C. In: *Clinical genetics* 64 (4), S. 269–281. DOI: 10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x.

- Vanier, Marie T. (2010): Niemann-Pick disease type C. In: *Orphanet journal of rare diseases* 5, S. 16. DOI: 10.1186/1750-1172-5-16.
- Vanier, Marie T. (2015): Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. In: *Journal of inherited metabolic disease* 38 (1), S. 187–199. DOI: 10.1007/s10545-014-9794-4.
- Vanier, Marie T.; Millat, Gilles (2004): Structure and function of the NPC2 protein. In: *Biochimica et biophysica acta* 1685 (1-3), S. 14–21. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2004.08.007.
- Vite, Charles H.; Bagel, Jessica H.; Swain, Gary P.; Prociuk, Maria; Sikora, Tracey U.; Stein, Veronika M. et al. (2015): Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. In: *Science translational medicine* 7 (276), 276ra26. DOI: 10.1126/scitranslmed.3010101.
- Vitner, E. B.; Dekel, H.; Zigdon, H.; Shachar, T.; Farfel-Becker, T.; Eilam, R. et al. (2010): Altered expression and distribution of cathepsins in neuronopathic forms of Gaucher disease and in other sphingolipidoses. In: *Human Molecular Genetics* 19 (18), S. 3583–3590. DOI: 10.1093/hmg/ddq273.
- Võikar, Vootele; Rauvala, Heikki; Ikonen, Elina (2002): Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. In: *Behavioural Brain Research* 132 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00380-1.
- Wachowiak, Matt; Shipley, Michael T. (2006): Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. In: *Seminars in cell & developmental biology* 17 (4), S. 411–423. DOI: 10.1016/j.semcdb.2006.04.007.
- Wakida, Kenji; Matsuyama, Zenjiro; Suzuki, Yasuyuki; Sawada, Michio; Tsurumi, Hisashi; Kimura, Akio et al. (2004): Diagnosis of adult type of Niemann-Pick disease (type C) in two brothers by filipin staining of bone marrow smears. In: *No to shinkei = Brain and nerve* 56 (12), S. 1047–1053.
- Walkley, Steven U. (2007): Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosome. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 96 (455), S. 26–32. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2007.00202.x.
- Walkley, Steven U.; Vanier, Marie T. (2009): Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (4), S. 726–736. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.014.
- Walz, Andreas; Omura, Masayo; Mombaerts, Peter (2006): Development and topography of the lateral olfactory tract in the mouse: imaging by genetically encoded and injected fluorescent markers. In: *Journal of neurobiology* 66 (8), S. 835–846. DOI: 10.1002/neu.20266.
- Wang, Jun Ming; Johnston, Patrick B.; Ball, Bret Gene; Brinton, Roberta Diaz (2005): The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (19), S. 4706–4718. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4520-04.2005.
- Wang, Jun Ming; Singh, Chanpreet; Liu, Lifei; Irwin, Ronald W.; Chen, Shuhua; Chung, Eun Ji et al. (2010): Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. In: *PNAS* 107 (14), S. 6498–6503. DOI: 10.1073/pnas.1001422107.
- Ward, Sarah; O'Donnell, Patricia; Fernandez, Steven; Vite, Charles H. (2010): 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with Niemann-Pick type C disease. In: *Pediatric research* 68 (1), S. 52–56. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3181df4623.
- Wasserstein, Melissa P.; Aron, Alan; Brodie, Scott E.; Simonaro, Calogera; Desnick, Robert J.; McGovern, Margaret M. (2006): Acid sphingomyelinase deficiency: prevalence and

characterization of an intermediate phenotype of Niemann-Pick disease. In: *The Journal of pediatrics* 149 (4), S. 554–559. DOI: 10.1016/j.jpeds.2006.06.034.

Weiler, Elke; Farbman, Albert I. (1998): Supporting cell proliferation in the olfactory epithelium decreases postnatally. In: *Glia* 22 (4), S. 315–328. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1136(199804)22:4<315::AID-GLIA1>3.0.CO;2-2.

Weintraub, H.; Abramovici, A.; Sandbank, U.; Booth, A. D.; Pentchev, P. G.; Sela, B. (1987): Dysmyelination in NCTR-Balb/C mouse mutant with a lysosomal storage disorder. Morphological survey. In: *Acta neuropathologica* 74 (4), S. 374–381. DOI: 10.1007/bf00687215.

Weintraub, H.; Abramovici, A.; Sandbank, U.; Pentchev, P. G.; Brady, R. O.; Sekine, M. et al. (1985): Neurological mutation characterized by dysmyelination in NCTR-Balb/C mouse with lysosomal lipid storage disease. In: *Journal of Neurochemistry* 45 (3), S. 665–672. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1985.tb04044.x.

Whitman, Mary C.; Greer, Charles A. (2009): Adult neurogenesis and the olfactory system. In: *Progress in Neurobiology* 89 (2), S. 162–175. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.07.003.

Wijburg, F. A.; Sedel, F.; Pineda, M.; Hendriksz, C. J.; Fahey, M.; Walterfang, M. et al. (2012): Development of a suspicion index to aid diagnosis of Niemann-Pick disease type C. In: *Neurology* 78 (20), S. 1560–1567. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182563b82.

Winner, Beate; Cooper-Kuhn, Christiana M.; Aigner, Robert; Winkler, Jürgen; Kuhn, H. Georg (2002): Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. In: *European Journal of Neuroscience* 16. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2002.02238.x.

Witt, Martin; Thiemer, René; Meyer, Anja; Schmitt, Oliver; Wree, Andreas (2018): Main Olfactory and Vomeronasal Epithelium Are Differently Affected in Niemann-Pick Disease Type C1. In: *International journal of molecular sciences* 19 (11). DOI: 10.3390/ijms19113563.

Wraith, J. E.; Guffon, N.; Rohrbach, M.; Hwu, W. L.; Korenke, G. C.; Bembi, B. et al. (2009): Natural history of Niemann-Pick disease type C in a multicentre observational retrospective cohort study. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 98 (3), S. 250–254. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.06.009.

Wraith, James E.; Vecchio, Darleen; Jacklin, Elizabeth; Abel, Larry; Chadha-Boreham, Harbajan; Luzy, Cécile et al. (2010): Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 99 (4), S. 351–357. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.12.006.

Xie, C.; Burns, D. K.; Turley, S. D.; Dietschy, J. M. (2000): Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 59 (12), S. 1106–1117. DOI: 10.1093/jnen/59.12.1106.

Yamada, A.; Saji, M.; Ukita, Y.; Shinoda, Y.; Taniguchi, M.; Higaki, K. et al. (2001): Progressive neuronal loss in the ventral posterior lateral and medial nuclei of thalamus in Niemann-Pick disease type C mouse brain. In: *Brain & development* 23 (5), S. 288–297.

Yan, Xin; Lukas, Jan; Witt, Martin; Wree, Andreas; Hübner, Rayk; Frech, Moritz et al. (2011): Decreased expression of myelin gene regulatory factor in Niemann-Pick type C 1 mouse. In: *Metabolic brain disease* 26 (4), S. 299–306. DOI: 10.1007/s11011-011-9263-9.

Yu, Ting; Lieberman, Andrew P. (2013): Npc1 acting in neurons and glia is essential for the formation and maintenance of CNS myelin. In: *PLoS Genet* 9 (4), e1003462. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003462.

Yu, Tun-Tzu; McIntyre, Jeremy C.; Bose, Soma C.; Hardin, Debra; Owen, Michael C.; McClintock, Timothy S. (2005): Differentially expressed transcripts from phenotypically identified olfactory sensory neurons. In: *J. Comp. Neurol.* 483 (3), S. 251–262. DOI: 10.1002/cne.20429.

Yuan, Junying; Lipinski, Marta; Degterev, Alexei (2003): Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death. In: *Neuron* 40 (2), S. 401–413. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00601-9.

Zampieri, Stefania; Mellon, Synthia H.; Butters, Terry D.; Nevyjel, Marco; Covey, Douglas F.; Bembi, Bruno; Dardis, Andrea (2009): Oxidative stress in NPC1 deficient cells. Protective effect of allopregnanolone. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (9b), S. 3786–3796. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00493.x.

Zervas, Mark; Dobrenis, Kostantin; Walkley, Steven U. (2001a): Neurons in Niemann-Pick Disease Type C Accumulate Gangliosides as Well as Unesterified Cholesterol and Undergo Dendritic and Axonal Alterations. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 60 (1), S. 49–64. DOI: 10.1093/jnen/60.1.49.

Zervas, Mark; Somers, Kyra L.; Thrall, Mary Anna; Walkley, Steven U. (2001b): Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. In: *Current Biology* 11 (16), S. 1283–1287. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00396-7.